

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

STIMULATION DES CANAUX «TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL
VANILLOID 4» PAR LA PARATHORMONE CHEZ L'OSTÉOBLASTE

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
JÉRÔME LIZOTTE

MARS 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je me dois de remercier mon directeur de maîtrise, le Dr Robert Moreau, qui m'a énormément aidé, encadré et supporté. Par son calme et sa motivation vis-à-vis la recherche, il a été pour moi un modèle en matière de réflexion scientifique et m'a permis d'accomplir un projet de recherche comprenant plusieurs défis. De plus, toute l'équipe du Dr Moreau m'a été d'une précieuse aide dans la réalisation des nombreuses manipulations. Enfin, je ne peux passer sous silence l'immense soutien technique que m'a apportée M. Denis Flipo du groupe de recherche TOXEN dans l'exécution des manipulations nécessitant la microscopie confocale.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|------------|
| TABLE DES MATIERES..... | III |
| LISTE DES ABREVIATIONS..... | V |
| LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES | VII |
| RESUME | IX |
| PROBLEMATIQUE | X |
| CHAPITRE 1: ETAT DES CONNAISSANCES | 1 |
| 1.1 OSTEOPOROSE..... | 1 |
| 1.2 TISSU OSSEUX & REMODELAGE | 2 |
| 1.3 PHASES DE REMODELAGE OSSEUX..... | 4 |
| 1.4 OSTEOCLASTES & RESORPTION OSSEUSE..... | 5 |
| 1.5 OSTEOBLASTES & FORMATION OSSEUSE | 6 |
| 1.6 HORMONE PARATHYROÏDIENNE ET SES EFFETS..... | 8 |
| 1.7 RECEPTEUR PTH ET VOIES DE SIGNALISATION..... | 11 |
| 1.8 EFFETS ANABOLIQUES DE LA PTH DANS LE TRAITEMENT DE L'OSTEOPOROSE.... | 14 |
| 1.9 LE CALCIUM..... | 15 |
| 1.9.1 <i>Le calcium et fonction cellulaire</i> | 16 |
| 1.9.2 <i>Le calcium et la migration cellulaire</i> | 17 |
| 1.9.3 <i>Le calcium et ses canaux</i> | 17 |
| CHAPITRE 2: HYPOTHESE ET OBJECTIFS | 20 |
| CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES..... | 21 |
| 3.1 CULTURE CELLULAIRE | 21 |
| 3.2 ÉTUDE DE L'EXPRESSION GENIQUE..... | 21 |
| 3.3 MESURE DE CALCIUM INTRACELLULAIRE..... | 22 |
| 3.3.1 <i>Mesure de calcium intracellulaire suite à des traitements stimulant l'influx calcique</i> | 23 |
| 3.3.2 <i>Effets de différents inhibiteurs sur l'influx calcique induits par la PTH</i> | 24 |
| 3.4 DOSAGE DE LA PRODUCTION D'AMP CYCLIQUE CHEZ LA LIGNEE MG-63 | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 3.5 ÉTUDE DE LA MIGRATION CELLULAIRE CHEZ LES CELLULES MG-63 | 26 |
| 3.6 ANALYSES MORPHOLOGIQUES DES CELLULES MG-63 | 26 |
| 3.7 ANALYSE DES RESULTATS..... | 27 |
| CHAPITRE 4 : PRESENTATION DES RESULTATS..... | 28 |
| 4.1. EXPRESSION GENIQUE DES RECEPTEURS DE LA PTH | 28 |
| 4.2. ANALYSES DE L'INFLUX CALCIQUE INDUIT PAR LA PTH..... | 29 |
| 4.3 EFFET DU DBAMPC ET IBMX SUR L'INFLUX CALCIQUE CHEZ LA LIGNEE MG-6331 | |
| 4.4 EFFET DE L'IBMX SUR L'INFLUX CALCIQUE MEDIE PAR PTH..... | 33 |
| 4.5 IDENTIFICATION DES CANAUX IMPLIQUES DANS L'INFLUX CALCIQUE INDUIT PAR LA PTH..... | 34 |
| 4.6 EXPRESSION DES CANAUX TRPV CHEZ LA LIGNEE OSTEOLASTIQUE MG-63 | 36 |
| 4.7 IDENTIFICATION DU CANAL TRPV RESPONSABLE DE L'INFLUX CALCIQUE INDUIT PAR PTH..... | 38 |
| 4.8 IMPLICATION DE LA PROTEINE KINASE A DANS L'INFLUX CALCIQUE INDUIT PAR LA PTH..... | 39 |
| 4.9 PRODUCTION D'AMPC PAR LES CELLULES OSTEOLASTIQUES MG-63 SUITE A DIFFERENTS TRAITEMENTS..... | 40 |
| 4.10 ÉTUDE DE LA MIGRATION CELLULAIRE CHEZ LES CELLULES MG-63 | 42 |
| 4.11 ANALYSES MORPHOLOGIQUES DES CELLULES MG-63 | 44 |
| CHAPITRE 5 : DISCUSSION | 49 |
| 5.1 EXPRESSION GENIQUE DES RECEPTEURS DE LA PTH | 49 |
| 5.2 ANALYSES DE L'INFLUX CALCIQUE INDUIT PAR LA PTH..... | 50 |
| 5.3 EFFETS DU DBAMPC ET IBMX SUR L'INFLUX CALCIQUE CHEZ LA LIGNEE MG-6350 | |
| 5.4 EFFET DE L'IBMX SUR L'INFLUX CALCIQUE INDUIT PAR PTH..... | 51 |
| 5.5 PRODUCTION D'AMPC PAR LES CELLULES OSTEOLASTIQUES MG-63 SUITE A DIFFERENTS TRAITEMENTS..... | 51 |
| 5.6 IDENTIFICATION DES CANAUX IMPLIQUES DANS L'INFLUX CALCIQUE | 53 |
| 5.7 EXPRESSION DES CANAUX TRPV CHEZ LA LIGNEE OSTEOLASTIQUE MG-63 | 53 |
| 5.8 IDENTIFICATION DU CANAL TRPV ET DE LA VOIE DE SIGNALISATION RESPONSABLE DE L'INFLUX CALCIQUE INDUIT PAR PTH..... | 54 |
| 5.9 ÉTUDE DE LA MIGRATION CELLULAIRE CHEZ LES CELLULES MG-63 | 55 |

| | |
|---|----|
| 5.10 ANALYSES MORPHOLOGIQUES DES CELLULES MG-63 | 56 |
| CONCLUSION | 58 |
| BIBLIOGRAPHIE | 60 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALP : phosphatase alcaline
AMP_c : adénosine monophosphate cyclique
AC : adénylate cyclase
BMU : unités multicellulaires de base
CREB : «cAMP response element-binding protein»
dbAMPc : dibutyryladénosine 3':5' cyclic monophosphate
DAG : diacylglycérol
FAK : «Focal Adhésion Kinase»
GADD : «Growth Arrest and DNA Damage»
GDP : guanosine 5'-diphosphate
GTP : guanosine 5'-triphosphate
IBMX : 3-isobutyl-1-méthylxanthine
IGF : «insulin-like growth factor»
IP₃ : inositol 1,4,5 triphosphate
MAPK : «mitogen-activated protein kinase»
M-CSF : «Macrophage colony stimulating factor»
OPG : ostéoprotégérine
PGE₂ : prostaglandine E₂
PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
PTH : hormone parathyroïdienne
PTHrP : «PTH related peptide»
RANK : «Receptor activator of nuclear factor- κ B»
RANKL : «Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand»
RE : réticulum endoplasmique
TNF- α : «Tumor necrosis factor α »
TRAP : phosphatase acide résistante au tartrate

TRP : «Transient receptor potential»
TRPC: «Canonical transient receptor potential»
TRPM: «Melastatin transient receptor potential»
TRPML: «Mucolipin transient receptor potential»
TRPN : «non-mecanosensible transient receptor potential»
TRPP : «polycystine transient receptor potential»
TRPV : «Vanilloid transient receptor potential»
VDCC : «Voltage dependent calcium channel»
Wnt : «Wingless-integration site»

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Etat des connaissances

Figure 1.1 : Représentation schématique de l'os lamellaire.

Figure 1.2: Représentation schématique de l'os spongieux.

Figure 1.3: Phases du remodelage osseux.

Figure 1.4: Structure primaire de l'hormone PTH humaine.

Figure 1.5: Biosynthèse de la vitamine D.

Figure 1.6 : Schéma de la signalisation cellulaire impliquée lors de l'activation de PTH1/2R par la PTH.

Figure 1.7. Régulation du calcium intracellulaire libre.

Figure 1.8. Schéma des différentes sous-familles de canaux TRP.

Matériel et méthodes

Tableau I. Liste des amorces utilisées.

Présentation des résultats

Figure 4.1: Expression génique des récepteurs de la PTH chez les cellules ostéoblastiques MG-63

Figure 4.2 : Effet de la PTH, du Forskolin et du PGE₂ sur les niveaux de calcium intracellulaire.

Figure 4.3 : Effet du dbAMPc et du IBMX sur les niveaux de calcium intracellulaire.

Figure 4.4: Potentialisation par l'IBMX de l'effet de la PTH, du Forskolin et du PGE₂ sur les niveaux de calcium intracellulaire.

Figure 4.5 : Effets de différents inhibiteurs de canaux cationiques sur l'influx calcique induit par la PTH.

Figure 4.6: Expression génique des canaux TRPV2 et TRPV4 chez les cellules ostéoblastiques MG-63.

Figure 4.7 : Effet des inhibiteurs de canaux TRPV2 (Tranilast) et TRPV4 (RN-1734) sur l'influx calcique induit par la PTH et le Forskolin.

Figure 4.8 : Effet de l'inhibiteur de PKA sur l'influx calcique induit par la PTH, le Forskolin, le PGE₂ et le dbAMPc.

Figure 4.9 : Effets de la PTH, Forskolin, des inhibiteurs rouge de Ruthénium, RN-1734, H-89, et les combinaisons de la PTH et Forskolin avec ces inhibiteurs sur la migration cellulaire.

Figure 4.10: Effets de la PTH, Forskolin, des inhibiteurs rouge de Ruthénium, RN-1734, H-89, et les combinaisons de la PTH et Forskolin avec ces inhibiteurs sur la morphologie des cellules MG-63.

Tableau II: Dosage des niveaux d'AMPc relatifs au contrôle chez les cellules MG-63 suite à un traitement PTH et PGE₂.

Tableau III: Dosage des niveaux d'AMPc relatif au contrôle chez les cellules MG-63 suite à des traitements avec IBMX, Forskolin et une combinaison IBMX et PTH.

Conclusion

Figure 6.1 : Schéma récapitulatif résumant les principaux résultats et perspectives.

Résumé

Le tissu osseux a la caractéristique d'être en perpétuel processus de remodelage osseux par des phases de résorption effectuées par les ostéoclastes, et des phases de formation réalisées par les ostéoblastes. Lorsqu'il y a un déséquilibre dans ce processus en faveur de l'activité ostéoclastique, il y a apparition de la condition d'ostéoporose qui se caractérise par une diminution de la masse osseuse et une augmentation du risque de fracture. Toutefois, l'hormone PTH est utilisée à titre de traitement contre l'ostéoporose afin de stimuler la formation osseuse. D'ailleurs, certains mécanismes cellulaires, comme la migration chez l'ostéoblaste nécessite davantage d'information notamment en lien avec le calcium et ces canaux. Cette étude vise donc à comprendre et à déterminer l'effet de l'hormone PTH sur le calcium intracellulaire et d'en caractériser la voie de signalisation ainsi que les effets sur les cellules ostéoblastiques MG-63. Il a été observé chez ces cellules que le récepteur PTH1R ne serait possiblement pas exprimé, contrairement au PTH2R, qui est bel et bien exprimé. Par la suite, il a été déterminé par des analyses de calcium intracellulaire qu'une stimulation par la PTH amène influx calcique lorsque potentialisé en présence d'IBMX. L'explication de cet effet de potentialisation subsiste en favorisant une production d'AMPc adéquate par un prétraitement avec l'IBMX. Suite à la démonstration de l'expression génique des canaux TRPV2 et TRPV4 chez la lignée MG-63, il a été déterminé que l'influx calcique stimulé par la PTH, et potentialisé par l'IBMX, serait véhiculé par le canal TRPV4, en raison de la perte de l'influx par l'inhibiteur spécifique de ce canal RN-1734. De plus, l'utilisation de l'inhibiteur de PKA démontre l'implication de la voie de signalisation AMPc/PKA lors de cet influx calcique. Ensuite, une inhibition de la migration cellulaire a été observée suite à des traitements lors d'une stimulation PTH. Cela se reflète également par l'absence de formation de projections cytoplasmiques filopodes lors d'analyse morphologique. Ainsi, ces résultats ont permis de démontrer que l'hormone PTH influence l'activité cellulaire ostéoblastique en lien avec le calcium. En conséquence de ces résultats, il serait intéressant d'utiliser un type cellulaire ostéoblastique connu pour exprimer PTH1R afin de comparer l'effet sur l'influx calcique stimulé par la PTH, et de plus, réaliser des traitements intermittents avec l'hormone sur la fonction de migration et la morphologie en lien avec le métabolisme calcique cellulaire. Ce projet a donc apporté de nouvelles connaissances, en vue d'un traitement de l'ostéoporose, sur l'action et les effets de l'hormone PTH en lien avec le calcium, ses canaux et les fonctions cellulaires ostéoblastiques.

Problématique

La maladie d'ostéoporose se caractérise par une diminution de la masse osseuse et d'une perturbation de la microarchitecture osseuse se manifestant par une augmentation accrue du risque de fracture. Elle survient lorsqu'il y a un déséquilibre, en faveur de l'ostéolyse, dans le processus de remodelage osseux entre l'activité des ostéoclastes et celle des ostéoblastes. Les ostéoclastes sont responsables de la résorption osseuse par l'acidification et digestion enzymatique du tissu, alors que les ostéoblastes procèdent à la synthèse de la nouvelle matrice organique et sa minéralisation.

Plusieurs molécules peuvent influencer ce processus de remodelage osseux, par exemple la vitamine D et les interleukines 3 et 6, et le TNF- α «tumor necrosis factor- α ». Également, la parathormone peut affecter le métabolisme osseux. Cette hormone est principalement connue comme étant un facteur de régulation du métabolisme phosphocalcique en cas d'hypocalcémie. Elle agit au niveau de différents tissus comme le rein afin de favoriser la réabsorption calcique et la synthèse de vitamine D pour l'absorption intestinale de l'ion. De plus, elle agit sur le tissu osseux en favorisant la synthèse du ligand RANK «receptor activator of nuclear factor kappa-B» afin d'activer les ostéoclastes et ainsi libérer du calcium dans la circulation sanguine par l'ostéolyse.

Toutefois, depuis quelques années, il est utilisé l'hormone PTH à titre de traitement de type discontinu contre l'ostéoporose. En effet, les études démontrent qu'à raison d'une dose journalière, l'hormone favorise la formation osseuse. De plus, il est démontré que l'hormone se fixe aux récepteurs PTH1R ou PTH2R et peut enclencher les voies de signalisation impliquant soit la protéine kinase A ou celle impliquant la phospholipase C.

Le calcium est un ion très important, à titre de second messager, dans diverses fonctions cellulaires comme la différenciation, prolifération et migration cellulaire. Spécialement chez l'ostéoblaste, la fonction de migration est primordiale, car ces derniers doivent être en mesure de migrer à la zone de formation osseuse et de synthétiser la nouvelle matrice. Cela dit, l'homéostasie intracellulaire calcique est d'une importance capitale et son entrée dans la cellule peut se faire par différents processus, entre autres par l'entremise des canaux TRP «transient receptor potential», qui agissent comme des senseurs extracellulaires. Ces canaux représentent une famille de canaux ioniques comportant sept sous-familles selon leur homologie de leur séquence en acides aminés. Par ailleurs, la sous-famille des canaux TRPV «transient receptor potential vanilloid» qui comprend six membres et son hautement sélectif au calcium. Enfin, une étude démontre que l'hormone PTH active les canaux TRPV5 chez les cellules rénales par l'entremise de la voie de signalisation PKA afin de permettre un influx calcique.

Le but de ce projet visait donc à caractériser l'effet de l'hormone PTH sur le métabolisme calcique intracellulaire et d'en caractériser la voie de signalisation et les effets sur les cellules ostéoblastiques MG-63.

Chapitre 1: État des Connaissances

1.1 Ostéoporose

L'ostéoporose est une condition pathologique pouvant être due à de multiples facteurs de risque comme la consommation excessive d'alcool et de cigarette, la sédentarité, l'alimentation, l'usage prolongé de médicaments, etc. Elle se caractérise par une diminution de la densité osseuse et l'altération de l'architecture du tissu osseux (WHO, 2003). Cette maladie métabolique peut être très invalidante étant donné qu'elle peut entraîner des fractures osseuses très graves comme des fractures du bassin et du fémur nécessitant une chirurgie et restreignant bien souvent un individu à des activités limitées. D'ailleurs, elle n'est généralement pas diagnostiquée avant qu'une fracture ne survienne étant donné l'absence de symptômes.

Selon l'organisme Ostéoporose Canada, plus de 2 millions de Canadiens sont atteints d'ostéoporose (LeMessurier *et al.*, 2012). Bien que la maladie puisse frapper à tout âge, un homme sur huit et une femme sur quatre souffrent de cette maladie après l'âge de 50 ans. Ainsi, les femmes en sont plus atteintes que les hommes en raison de la baisse du taux de l'hormone œstrogène lors de la ménopause. C'est donc dire que les coûts reliés au traitement de la maladie ne cesseront pas d'augmenter étant donné que la population vieillit et devient de plus en plus sédentaire et choisit des habitudes de vie favorisant cette condition. Enfin, une meilleure compréhension des processus physiologiques liés au tissu osseux et au développement de l'ostéoporose permettra de développer des méthodes de prévention ainsi que des stratégies de traitement efficace afin d'améliorer la condition de santé des gens, et ainsi réduire les dépenses reliées à la maladie.

1.2 Tissu osseux & Remodelage

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé étant donné la nature solide de sa matrice extracellulaire. C'est ce tissu qui compose le squelette et qui joue trois fonctions importantes, soit mécanique, hématopoïétique et métabolique. En effet, ce tissu a la particularité d'être très résistant de par sa composition matricielle lui conférant une grande solidité mécanique. Ainsi, les os de la cage thoracique offrent une protection pour les organes vitaux et les os de la boîte crânienne protègent le cerveau. De plus, les os longs servent de point d'ancrage aux muscles, ce qui permet la locomotion. Par ailleurs, plusieurs os renferment la moelle osseuse contenant les cellules hématopoïétiques, contribuant ainsi au maintien et au renouvellement de plusieurs types cellulaires tels les érythrocytes, les monocytes et les macrophages. Enfin, étant donné que l'os est un tissu dynamique soumis à un remodelage constant, il participe ainsi à la mise en réserve et à la mobilisation du calcium selon les besoins de l'organisme. La matrice de l'os se compose de deux phases, soit organique et minérale. La matrice organique est constituée principalement de microfibrilles de collagène de type I (90%), mais également de protéines dites non-collagéniques (10%) telles l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine, la thrombospondine et des protéoglycanes (Trouvin et Goeb, 2010). Quant à la phase minérale, elle se compose de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) qui sont formés à partir de phosphate et de carbonate de calcium. Ainsi, ces cristaux s'incrusteront entre et à l'intérieur des fibres de collagène (Fazzalari, 2008)

Il existe trois types de tissus osseux qui se différencient par leurs degrés de maturation et d'organisation : réticulaire, lamellaire et spongieux. Le premier est considéré comme l'os immature en raison de son réseau irrégulier de fibres de collagène. De plus, il est considéré mécaniquement faible et est caractéristique des os chez le fœtus et lors de la réparation d'une fracture osseuse (Owen, 1978). L'os lamellaire ou compact est le tissu osseux le plus abondant (plus de 90 % du tissu osseux du squelette) retrouvé chez l'adulte et est considéré comme mature, donc beaucoup plus fort mécaniquement. La matrice osseuse est disposée en lamelles superposées dans lesquelles les fibres de collagènes sont agencées de façon parallèle

(figure 1.1). Ce type de tissu osseux est constitué d'ostéons ou systèmes de Havers qui sont composés de 4 à 20 lamelles cylindriques disposées concentriquement autour du canal de Havers, qui lui, contient des vaisseaux sanguins et fibres nerveuses. Entre les lamelles se trouvent des lacunes contenant les ostéocytes (cellule ostéoblastique différenciée et emprisonnée dans la matrice). Les canaux de Havers sont reliés avec de canaux transversaux : les canaux de Volkmann (Owen, 1978).

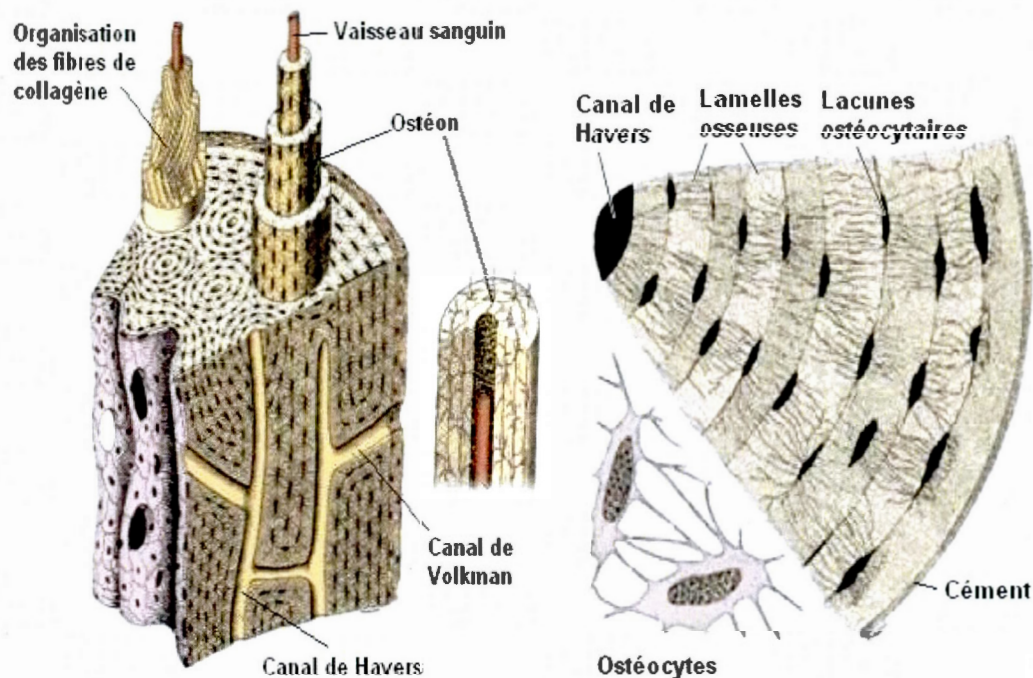


Figure 1.1: Représentation schématique de l'os lamellaire. À gauche, l'organisation générale des ostéons ou systèmes de Havers et à droite, un agrandissement d'une coupe transversale dans un de ces ostéons. Les explications de cette image se retrouvent dans le texte ci-haut. (Tirée et adaptée de Owen, 1978)

Le dernier type de tissu osseux, l'os spongieux, représente environ 10% du squelette chez l'adulte (figure 1.2). Il se trouve plus particulièrement dans les os courts (vertèbre) et plats (sternum) et dans les extrémités (épiphyse) des os longs. Il est constitué de trabécules de tissu osseux compact disposées de façon non concentrique permettant la présence de cavités occupées par la moelle osseuse (Tirée de Owen, 1972).

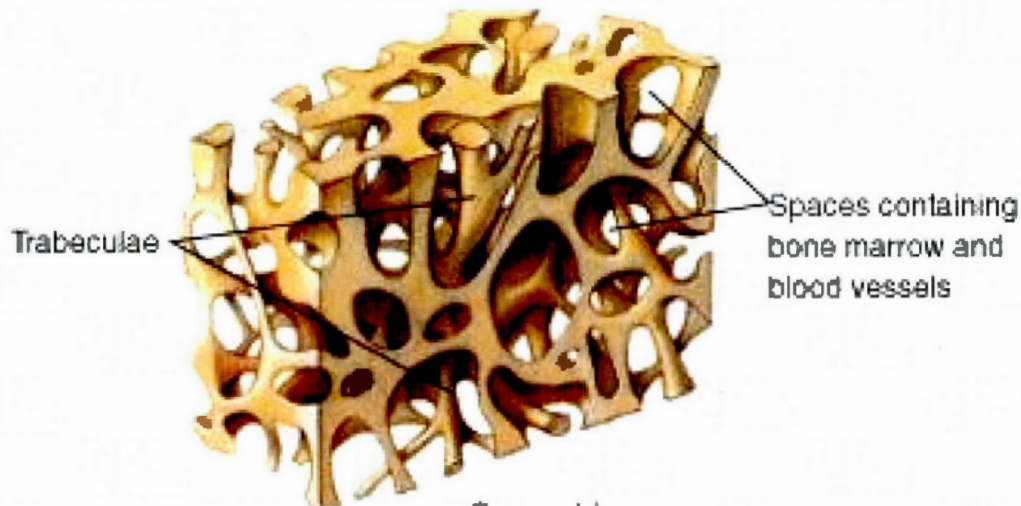


Figure 1.2. Représentation schématique de l'os spongieux. Ce type d'os est constitué de trabécules entre lesquels se loge la moelle osseuse. (Tirée de Straus, 2001)

L'os a la particularité d'être en perpétuel processus de remodelage afin de permettre sa croissance, sa réparation, et ainsi maintenir l'intégrité du squelette aussi bien que l'homéostasie calcique. Ce processus de remodelage repose sur des unités fonctionnelles de remodelage qui permettent de former un environnement adéquat pour exercer les phases de résorption et de formation du tissu osseux qui sont orchestrées par des cellules spécialisées : les ostéoblastes et les ostéoclastes. Enfin, un cycle complet de remodelage du tissu osseux peut durer environ 5 à 6 mois chez l'être humain adulte (Fazzalari, 2008).

1.3 Phases de remodelage osseux

Brièvement, le remodelage osseux est caractérisé par différentes phases (figure 1.3) qui s'effectuent dans des unités multicellulaires de base (BMU). Un cycle de remodelage débute, sous l'influence des ostéoblastes et de facteurs hormonaux (vitamine D, hormone parathyroïdienne (PTH)), par la phase d'activation des ostéoclastes. Une fois recrutés à la surface osseuse, les ostéoclastes procèdent à

la phase de résorption osseuse par dissolution et dégradation des phases minérale et organique de la matrice osseuse. Ensuite, il y a une phase d'inversion marquée par le retrait des ostéoclastes qui sont remplacés par des macrophages agissant comme polisseurs du fond de la lacune créée par les ostéoclastes. Enfin, les ostéoblastes parviennent à la surface de l'os et synthétisent le nouveau tissu osseux par la production d'une matrice collagèneuse et effectuent la minéralisation de celle-ci. Les sections suivantes aborderont en détail les différentes phases du remodelage.

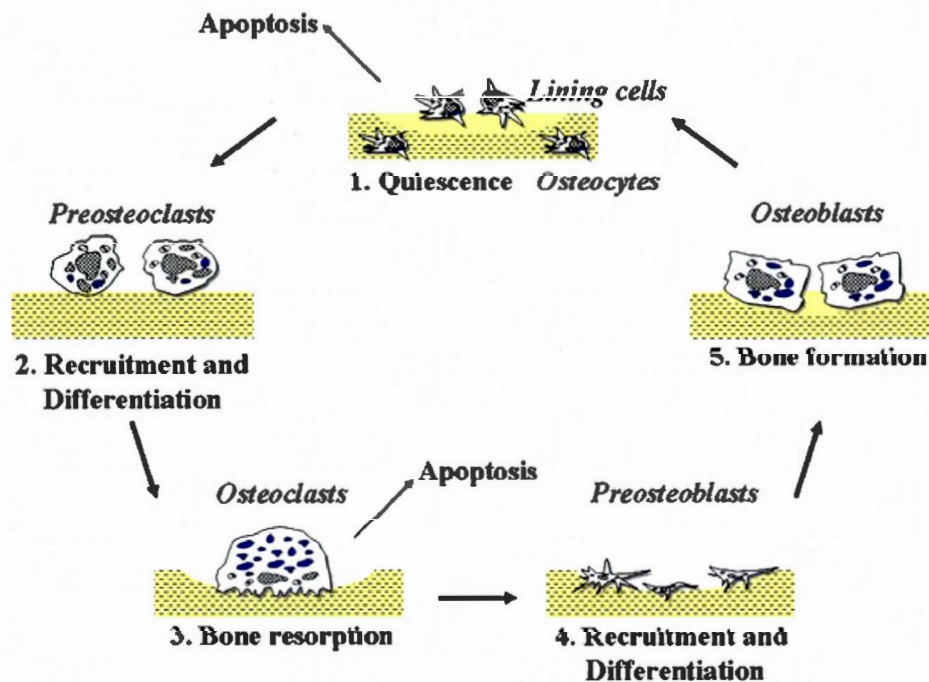


Figure 1.3: Phases du remodelage osseux. Après une phase de quiescence [1], les ostéoclastes sont activés [2] et procèdent à la résorption du tissu osseux [3]. Ensuite, les ostéoblastes vont être recrutés au site de résorption et vont se différencier [4]. Par la suite, les ostéoblastes matures sécrètent des fibres de collagène et les minéralisent pour former la nouvelle matrice [5]. Une fois le nouveau tissu osseux formé, l'os retourne en phase de quiescence. (Tirée de Fazzalari, 2008)

1.4 Ostéoclastes & Résorption osseuse

Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées qui proviennent de cellules souches de la lignée monocyte/macrophage issue de la moelle osseuse. Ayant comme particularité d'être très volumineux et mobile sur la surface du tissu osseux, l'ostéoclaste est responsable de la phase de résorption osseuse dans le remodelage. Leur différenciation est dirigée par le préostéoblaste qui sécrète le «macrophage

colony-stimulating factor » (M-CSF) et par des contacts cellulaires, c'est-à-dire par l'entremise du « receptor activator of nuclear factor kappa B ligand » (RANK-L) (Dimitrova *et al.*, 2011). Ce ligand, situé sur la membrane plasmique des préostéoblastes, se lie au récepteur RANK localisé sur la membrane des préostéoclastes afin de stimuler leur différenciation (Trouvin et Goeb, 2010). De plus, cette liaison peut être empêchée par la sécrétion ostéoblastique de l'ostéoprotégérine (OPG). Ce récepteur soluble se lie à RANKL afin de bloquer la différenciation ainsi que l'activation des ostéoclastes (Trouvin et Goeb, 2010). Suite à la stimulation par ces facteurs, les préostéoclastes fusionnent pour former l'ostéoclaste et celui-ci se dirige vers le site de remodelage osseux au sein des BMU. Ainsi activés, les ostéoclastes développent leur appareil lysosomal et se polarisent afin de pouvoir sécréter les enzymes permettant la dégradation du tissu osseux, notamment la phosphatase acide résistante au tartrate (TRAP) (Gothlin et Ericsson, 1976). Le domaine apical de l'ostéoclaste a la forme d'une bordure en brosse permettant son ancrage afin de dégrader l'os, fournissant ainsi un environnement de résorption appelé : lacune de Howship. Les invaginations tubulaires cytoplasmiques de cette bordure en brosse contiennent des pompes à proton couplées à l'anhydrase carbonique II qui permettent la sécrétion d'ions H^+ , produisant ainsi la dissolution acide de la phase minérale de la matrice osseuse. En plus de la TRAP, la cellule déverse d'autres enzymes lysosomiales dirigées contre la phase organique de la matrice, telles des collagénases, métalloprotéinases et cathepsines (Gothlin et Ericsson, 1976).

1.5 Ostéoblastes & Formation osseuse

Les ostéoblastes sont des cellules provenant des cellules souches mésenchymateuses du stroma médullaire. Les précurseurs de ces cellules proviennent quant à eux de la prolifération de clones de cellules pluripotentes ayant la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires comme des adipocytes et des myoblastes. Plusieurs facteurs sont responsables de la prolifération et la différenciation de l'ostéoblaste tels les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs)

et le facteur de transcription Cbfa1/Runx2 (Yamaguchi, Komori et Suda, 2000). Devenus matures, les ostéoblastes sont de forme cubique et possèdent un réticulum endoplasmique (RE) rugueux abondant et un appareil de Golgi volumineux en raison de leur participation importante dans la synthèse protéique associée à la formation osseuse. Ainsi, cette cellule a comme rôle de synthétiser la nouvelle matrice osseuse ainsi que d'assurer sa minéralisation (Fazzalari, 2008). L'ostéoblaste amorce tout d'abord la synthèse de la nouvelle matrice osseuse non minéralisée par le dépôt de collagène de type I afin de combler l'espace créé par la résorption. Cette protéine est premièrement sécrétée sous forme d'un précurseur protéique qui subit par la suite une protéolyse dans le milieu extracellulaire. Ensuite, ces molécules forment des agencements de fibrilles de collagène afin de produire des faisceaux. Une fois la matrice collagénieuse déposée, la minéralisation de celle-ci est effectuée par le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite qui sont produits suite à une augmentation de la concentration de calcium, de phosphate et de pyrophosphate à l'aide de l'activité de la phosphatase alcaline (également un marqueur important de la formation osseuse), une enzyme produite par l'ostéoblaste et qui est sécrétée sous une forme associée à des vésicules matricielles. De plus, l'ostéoblaste sécrète d'autres protéines non collagénieuses comme l'ostéocalcine qui favorise la fixation du calcium extracellulaire à la nouvelle matrice et qui sert de marqueur biochimique de la formation osseuse. Après cette activité sécrétrice, l'ostéoblaste mature se différencie en ostéocyte, s'insérant finalement dans la matrice osseuse. Même si les ostéocytes se retrouvent trappés dans le tissu osseux, ils participent au maintien de la matrice osseuse et contribuent à l'homéostasie calcique. En effet, les ostéocytes possèdent des prolongements cytoplasmiques formant des jonctions communicantes entre les autres ostéocytes et les cellules à la surface du tissu osseux. Ces dernières cellules sont appelées des cellules dites «bordantes» qui sont des ostéoblastes au repos et qui ont la capacité, s'ils sont sollicités, de redevenir des cellules actives. Enfin, ces processus de remodelage osseux sont soumis à différents facteurs afin d'assurer le rôle métabolique de l'os.

Pour ce projet, le modèle cellulaire utilisé est la lignée ostéoblastique humaine MG-63. Ces cellules sont des préostéoblastes représentant un phénotype immature et possèdent une grande capacité de croissance. Leur réponse à la vitamine D est semblable aux ostéoblastes humains normaux et ces cellules expriment plusieurs molécules propres aux ostéoblastes comme l'enzyme phosphatase alcaline (ALP), l'ostéocalcine et l'ostéonectine. De plus, elles ont la capacité de synthétiser le collagène de type I pour la formation de la matrice osseuse (Czekanska *et al.*, 2012).

1.6 Hormone Parathyroïdienne et ses effets

L'hormone parathyroïdienne (PTH) est une protéine comprenant 84 acides aminés (Figure 1.4) et qui est synthétisée et sécrétée par les cellules principales de la glande parathyroïde.

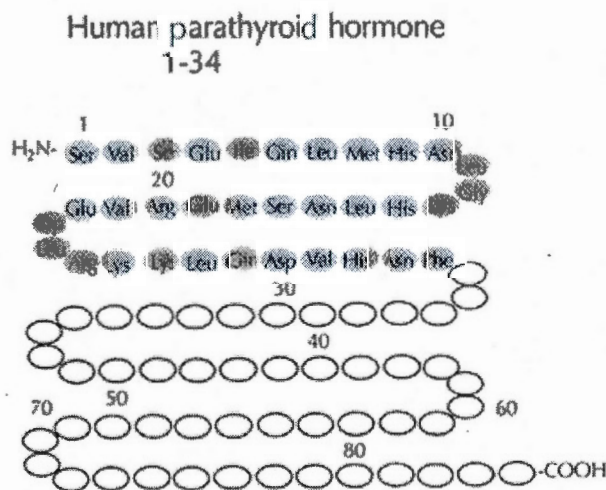


Figure 1.4: Structure primaire de l'hormone PTH humaine. Cette hormone possède 84 acides aminés, mais ce sont les 34 premiers (identifiés ci-haut) qui procurent la bioactivité de l'hormone. (Tirée de Brewer *et al.*, 1972)

Dans les cellules principales de la glande, l'hormone est produite sous forme de précurseur désigné prépro-PTH (115 acides aminés) suite à la traduction initiale par les ribosomes. Par la suite, ce précurseur est clivé dans le RE rugueux dans sa portion N-terminale en pro-PTH (90 acides aminés). Enfin, un clivage protéolytique

produit la forme active de l'hormone PTH (84 acides aminés) dans l'appareil de Golgi (Brewer *et al.*, 1972). Cette hormone joue un rôle central dans l'homéostasie du calcium et du phosphore (Hodsman *et al.*, 2005). Le signal menant à sa sécrétion est une baisse de la calcémie qui est décelée par le récepteur sensible au calcium localisé à la membrane des cellules de la parathyroïde (Chakravarti, Chattopadhyay et Brown, 2012). Ce récepteur est couplé à une protéine G et est également exprimé dans le rein afin de contrôler la réabsorption calcique et dans la glande thyroïde afin de contrôler la sécrétion de calcitonine, une hormone à l'effet opposé à la PTH (Ward *et al.*, 2012). L'effet engendré lors de la sécrétion de l'hormone PTH est une augmentation de la concentration calcique dans le sang afin de pallier à l'hypocalcémie. Pour ce faire, cette hormone cible différents organes de façon directe, tels le rein et l'os, et indirectement l'intestin. Quant à son effet sur le rein, la PTH favorise la réabsorption du calcium par les tubules distaux de la branche ascendante large de l'anse de Henle (Ward *et al.*, 2012). Au niveau de cette branche, des canaux calciques et des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sont activés favorisant ainsi la réabsorption de calcium. Un autre effet sur le rein est la stimulation de la production de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, qui est la forme active de la vitamine D. Cette vitamine est synthétisée par une réaction photochimique ou bien apportée par l'alimentation sous forme inactive (cholécalférol). Ensuite, elle subit, dans le foie, une réaction d'hydroxylation de la molécule par l'enzyme 25-hydroxylase produisant ainsi la molécule 25-hydroxy-cholécalférol. Une seconde hydroxylation stimulée par l'enzyme 1-alpha-hydroxylase dans le rein permet la production de la forme active de la vitamine 1,25 dihydroxy-cholécalférol, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ou vitamine D (Figure 1.5) (Hartmann *et al.*, 2012). Cela dit, le rôle déterminant de la PTH est de stimuler l'activité de l'enzyme 1-alpha-hydroxylase dans le rein pour l'activation de la vitamine D. Cette vitamine permet l'absorption intestinale (petit intestin) du calcium par des canaux calciques comme TRPV6 («Transient Receptor Potential Vanilloid-6») en favorisant l'augmentation de l'expression de ce transporteur calcique (Mutgi et Koo, 2012).

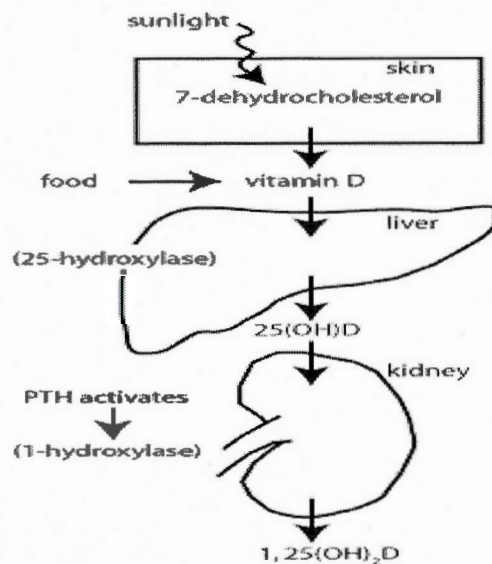


Figure 1.5: Biosynthèse de la vitamine D. La vitamine D provient de l'alimentation ou par l'activation photochimique par les rayons UV en vitamine D₃ à la peau. Ensuite, cette dernière subit des réactions d'hydroxylation dans le foie et dans le rein par des enzymes hydroxylases menant ainsi à la forme active de la vitamine D. L'hormone PTH active l'enzyme 1- α -hydroxylase dans le rein (tirée de Hartmann *et al.*, 2012).

La PTH peut produire un troisième effet en réponse à l'hypocalcémie, en agissant directement sur l'os. Étant donné que ce tissu contient beaucoup de calcium, l'os constitue donc un très grand réservoir de cet ion. Ainsi, en cas de baisse de la calcémie, la PTH stimule une mobilisation du calcium contenu dans le tissu osseux (Poole et Reeve, 2005). Comme décrit précédemment, l'ostéoclaste est responsable de la résorption osseuse. Toutefois, cette cellule ne possède pas de récepteur pour la PTH. Alors, la PTH agit plutôt sur l'ostéoblaste afin de stimuler la synthèse du RANKL, ce qui permet d'activer les ostéoclastes menant à une résorption osseuse. De la même manière, la synthèse du facteur OPG produit par l'ostéoblaste, qui empêche la liaison de RANKL à son récepteur sur l'ostéoblaste, est diminuée. Cela dit, la résorption osseuse enclenchée par la PTH mène donc à un relargage du calcium dans la circulation sanguine dans le but de renverser l'hypocalcémie (Poole et Reeve, 2005).

1.7 Récepteur PTH et voies de signalisation

Comme mentionnées précédemment, les principales cibles de l'hormone PTH sont le rein, le tissu osseux et indirectement l'intestin. Afin de véhiculer l'effet de l'hormone chez les mammifères, celle-ci se lie aux cellules de ces organes par le récepteur de la PTH/PTHrP «PTH related peptide» (PTHR). Le PTHrP, qui présente une importante homologie avec la PTH dans leur séquence des 13 premiers acides aminés, peut se lier au même récepteur que la PTH et peut donc mimer l'action de la PTH. Par contre, ce peptide est sécrété par une variété de types de tissus tant normaux que malins. Il peut également agir comme un facteur paracrine ou autocrine (Schluter, 1999). En fait, ce récepteur qui a la capacité de lier la PTH et le PTHrP est identifié comme le PTH1R.

Il y a un second type de récepteur qui peut lier la PTH, soit le PTH2R. Quant à son homologie avec le PTH1R, le PTH2R est semblable à 51%. La différence majeure est qu'il ne lie pas ou que très faiblement le PTHrP (Mannstadt, Juppner et Gardella, 1999). Selon la littérature, sa distribution serait plus importante dans le cerveau et le pancréas (Usdin, Gruber et Bonner, 1995). Il a été déterminé que dans les cellules chimères exprimant les deux récepteurs (PTH1R et PTH2R), la réponse à l'hormone se fait de façon équivalente pour les deux types de récepteurs.

Une fois liée à un de ces récepteurs, la PTH déclenche des voies de signalisation dépendantes de la protéine G couplée au récepteur PTH1/2R (figure 1.6). Cette protéine G comporte différentes sous-unités : α , β , γ . Ainsi, l'activation de l'un de ces deux récepteurs peut stimuler la sous-unité $G\alpha$, favorisant l'échange d'un GDP (guanosine 5'-diphosphate) par un GTP (guanosine 5'-triphosphate) au sein du complexe trimérique ce qui entraîne la dissociation de la sous-unité $G\alpha$, associée au GTP. Cette sous-unité active par la suite l'adénylate cyclase (AC) (Rey *et al.*, 2006). Il est à noter que d'autres molécules peuvent mener à l'activation de l'AC par l'entremise de son récepteur. Par exemple, la prostaglandine E_2 , lorsqu'elle

se lie à son récepteur couplé à une protéine G active, de même manière que la PTH, la sous-unité $G\alpha_s$ provoquant ainsi une augmentation des niveaux d'AMPc chez les ostéoblastes (Li, Thompson et Paralkar, 2007)

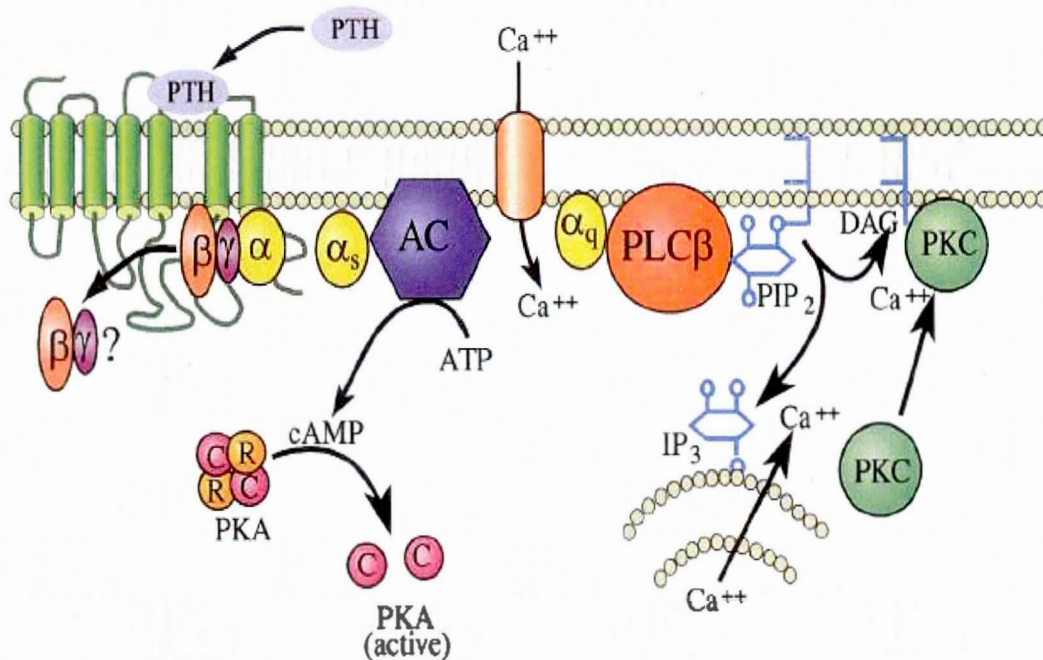


Figure 1.6 : Schéma de la signalisation cellulaire impliquée lors de l'activation de PTH1/2R par la PTH. Les explications complètes de l'image se retrouvent dans le texte. (Tirée de Rey *et al.*, 2006)

Cette dernière enzyme catalyse la conversion de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Par la suite, ce second messager vient se fixer sur les sous-unités régulatrices de la protéine kinase A (PKA). Cela permet ainsi la libération des sous-unités catalytiques de PKA dans le but de produire leurs effets cellulaires. Ces sous unités libérées peuvent d'une part produire un effet dans le cytosol ou à la membrane en phosphorylant des canaux ioniques, des récepteurs ou bien des protéines importantes. D'autre part, ces sous-unités peuvent également pénétrer le noyau cellulaire et agir sur la transcription génique en phosphorylant des protéines CREBs «cAMP response element-binding» (Ohta *et al.*, 2008). Également, l'hormone PTH peut déclencher la voie de signalisation impliquant la protéine kinase C (Rey *et al.*, 2006). Cela se fait par l'entremise de l'activation de la sous-unité $G\alpha_q$. Cette sous-unité active la phospholipase $C\beta$ (PLC β), ce qui permet

l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP₂) en diacylglycerol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). Le DAG et l'IP₃ agissent en tant que second messenger afin de stimuler le relargage du calcium contenu dans le RE lisse, et permettent l'activation de la protéine kinase C (PKC) à la membrane plasmique. La PKC est une kinase qui a la capacité de contrôler différentes fonctions cellulaires en phosphorylant des résidus sérine et thréonine de protéines importantes comme «epidermal growth factor récepteur» EGFR, les kinases Raf et MAPK «mitogen-activated protein kinase» (Mellor et Parker, 1998).

Concernant les effets de la PTH impliquant la voie de l'AMPc, les études démontrent que c'est la portion N-terminale de la PTH, soit les 34 premiers acides aminés (1-34), qui sont responsables de l'activation du récepteur. De plus, ce sont les deux premiers acides aminés qui permettent l'induction de la voie de l'AMPc (Brewer *et al.*, 1972). Une fois l'AMPc produite, il a été démontré que les facteurs de transcription Cbfa/Runx2, qui sont impliqués dans la différenciation ostéoblastique, pouvaient être phosphorylés par la PKA, de même que les protéines CREBs (Krishnan *et al.*, 2003). Une fois activées, les protéines CREBs peuvent induire la transcription du gène *c-fos*, reconnu comme étant un régulateur de la prolifération et de la différenciation cellulaires (Tyson, Swarthout et Partridge, 1999). Des études affirment que l'expression de l'enzyme phosphatase alcaline, qui est impliquée dans le processus de minéralisation, est aussi modulée par la voie de signalisation dépendante de PKA. *In vitro*, dépendamment de la confluence de la culture cellulaire, la PTH peut augmenter l'expression de l'enzyme avant l'obtention de la confluence cellulaire, alors que l'expression est diminuée après obtention de la confluence (Kano *et al.*, 1994). De plus, l'ostéoclastogenèse semble être influencée par la voie impliquant AMPc/PKA. En effet, l'activation de cette voie par la PTH augmente l'expression de RANKL et diminue celle de l'OPG (Huang *et al.*, 2004).

1.8 Effets anaboliques de la PTH dans le traitement de l'ostéoporose

Pour le traitement de l'ostéoporose, plusieurs méthodes ont été développées à partir de différents types de médicaments comme les bisphosphonates ainsi que les suppléments en calcium et vitamine D. Les bisphosphonates inhibent l'activité de résorption des ostéoclastes en raison de sa structure similaire au pyrophosphate, inhibant ainsi les enzymes ostéoclastiques nécessitant le pyrophosphate. Également, les bisphosphonates sont souvent prescrits en combinaison avec des suppléments en calcium et vitamine D afin de préserver une masse osseuse adéquate. Toutefois, ces traitements n'amènent pas d'amélioration significative de la formation osseuse et ainsi, de la masse osseuse. Dernièrement, une thérapie prometteuse qui semble stimuler la formation osseuse dans la maladie de l'ostéoporose est l'hormone PTH, administrée sous forme recombinante (médicament désigné tériparatide). Le paramètre qui semble être déterminant est la façon avec laquelle l'hormone est prise, c'est-à-dire de façon intermittente. Tel qu'expliqué précédemment, l'hormone PTH stimule la résorption osseuse par les ostéoclastes afin de contrer une condition d'hypocalcémie. Par contre, des études démontrent que la prise de l'hormone PTH de façon intermittente, à raison de 20 µg/jour (qui est considéré comme une faible dose de PTH) durant 6 à 24 mois, permettait l'augmentation du volume et la masse osseuse du squelette (Cranney *et al.*, 2006). Les hypothèses avancées pour expliquer le phénomène de stimulation de la formation osseuse par l'administration de l'hormone sont nombreuses, complexes et semblent incomplètes dans la littérature. Les différents mécanismes impliqués sont à la fois directs et indirects. La PTH agirait directement en prévenant l'apoptose de la lignée cellulaire ostéoblastique. Une explication qui est avancée est que l'hormone favoriserait la réparation de l'ADN et la suppression de la protéine proapoptotique GADD-153 «Growth Arrest and DNA Damage» (Schnoke, Midura et Midura, 2009). La PTH agirait indirectement au niveau du contrôle de différents facteurs comme «Insulin-like growth factor» (IGF-1), un puissant facteur anabolique qui est impliqué dans le processus d'absorption de calcium et dans l'élargissement et l'allongement de l'os en stimulant la prolifération des chondrocytes (Misiorowski, 2011). De plus, la PTH aurait la capacité de supprimer l'expression de la sclérotine, qui a comme fonction

de bloquer la voie de signalisation Wnt «wingless-integration site» pour la différenciation des ostéoblastes, menant ainsi à l'augmentation de leur nombre. (Misiorowski, 2011). Également, il a été démontré que la PTH induirait le gène *c-fos* afin d'augmenter la différenciation et la prolifération des ostéoblastes (Hock, 2001). Les études cliniques concernant le traitement de l'ostéoporose et des fractures osseuses sont toujours en cours afin de comprendre plus profondément les mécanismes cellulaires et moléculaires de la téraparatide, qui est le seul agent approuvé stimulant la formation osseuse. Enfin, il est connu que le calcium est impliqué dans la signalisation activée par l'hormone PTH à titre de cofacteur, ainsi une grande importance doit être accordée à cet ion en lien avec les effets produits par cette hormone.

1.9 Le calcium

Généralement, la concentration intracellulaire du calcium libre est maintenue à des niveaux très bas, environ 1-10 nM, mais elle peut se retrouver beaucoup plus élevée dans les organites soit environ 100 nM dans le réticulum endoplasmique. Enfin, dans le milieu extracellulaire, il se maintient à environ 1-2 mM. Cela dit, la régulation de la concentration calcique intracellulaire peut s'effectuer par divers types de canaux ioniques situés à la membrane plasmique (canaux activés par le voltage tels les VDCC ou non activés par le voltage comme les TRPs, des pompes calciques, et des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) et au RE pour la mobilisation calcique (récepteur canal IP_3 et des pompes calciques) (Macrez et Mironneau, 2004). De plus, différentes voies permettent d'obtenir une augmentation de calcium dans la cellule, dont celle appelée entrée de calcium capacitif (Putney et McKay, 1999). Ce mécanisme est lié à l'état des réserves en calcium du RE. Ainsi, suite à une déplétion de ces réserves, des canaux localisés à la membrane plasmique soit les TRPC sont activés afin de reconstituer les réserves de calcium (Figure 1.7).

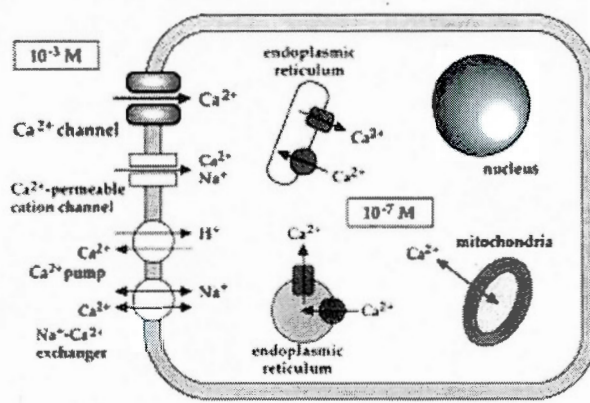


Figure 1.7. Régulation du calcium intracellulaire libre. L'homéostasie calcique intracellulaire peut se faire par différents mécanismes et canaux selon la source de calcium. Les détails de la figure sont expliqués ci-haut. (Yamakage et Namiki, 2002).

1.9.1 Le calcium et fonction cellulaire

Le calcium est un ion dont l'importance est capitale pour les processus physiologiques cellulaires. Le calcium interne de la cellule agit comme second messenger pour plusieurs fonctions comme la contraction musculaire, la division cellulaire, l'activité enzymatique et la mort cellulaire (Macrez et Mironneau, 2004). Le calcium participe dans la contraction musculaire squelettique lorsqu'il est relâché par le réticulum sarcoplasmique suite à la dépolarisation de la cellule et ce calcium se lie à la troponine C des myofibrilles pour procéder à la contraction musculaire (Macrez et Mironneau, 2004). Le calcium permet également la régulation de plusieurs enzymes comme la synthase d'oxyde nitrique, l'adénylate kinase et des protéines phosphatases en se liant avec celles-ci en complexe avec la calmoduline menant à l'activation de l'enzyme (Macrez et Mironneau, 2004).

1.9.2 Le calcium et la migration cellulaire

La migration cellulaire est une caractéristique cellulaire importante pour différents processus comme la réponse immunitaire, la guérison de blessure et le remodelage osseux (Raisz, 1999). Ce processus semble d'ailleurs très méconnu chez l'ostéoblaste. Selon la littérature, une théorie avancée pour expliquer le mécanisme de migration stipule qu'à l'avant de la cellule, il y aurait un site de polymérisation des filaments d'actine menant à la formation de projections cytoplasmiques dites filopodes (Xue, Janzen et Knecht, 2010). Ce qui engendrerait le mouvement chez la cellule, ce serait une dynamique d'assemblage et de désassemblage des filaments d'actine véhiculé par l'hydrolyse d'ATP (Pollard et Borisy, 2003). Enfin, le calcium serait impliqué dans ce mécanisme de migration à titre de signal. En effet, un influx calcique est induit lors du stress engendré par la déformation cellulaire et agirait à titre de rétrocontrôle (Ryan, Watanabe et Vavylonis, 2012). Cela indique donc que l'influx calcique peut moduler le processus de migration cellulaire.

1.9.3 Le calcium et ses canaux

Le calcium entre dans la cellule selon un mode de transport facilité impliquant des canaux ioniques. Selon le type cellulaire et le mode d'activation, divers canaux ioniques ont été identifiés. Tout d'abord, il y a les canaux calciques dépendants du voltage qui se retrouvent principalement dans les excitables comme les cellules du muscle et les neurones, mais également dans les cellules non excitables comme les ostéoblastes. Dans les cellules excitables, ils sont activés suite à une dépolarisation de la cellule ou bien par déformation mécanique (Hofmann, Lacinova et Klugbauer, 1999). Donc, une fois activés, ils permettent un influx calcique qui peut mener à différents effets dépendamment du type cellulaire, comme la contraction musculaire, l'excitation neuronale ou peut être impliqué dans la prolifération et différenciation cellulaire. Il y a plusieurs familles de canaux VDCC, soit T, N, L/P/Q, et R qui se différencient par leur voltage d'activation et d'inactivation, la conductance, la sélectivité ionique et leurs antagonistes. (Hofmann, Lacinova et Klugbauer, 1999).

Les canaux TRP représentent une superfamille de canaux cationiques divisée en sept familles selon leur homologie d'acides aminés et comprenant 28 membres: TRPC1 à TRPC7 (canonique), TRPV1 à TRPV6 (vallinoïde), TRPM1 à TRPM8 (mélastatine), TRPP1 et TRPP2 (polycystine), TRPML1 à TRPML3 (mucolipine), TRPA1 (ankyrine) et TRPN (non-mécanosensible, *nompC*) (Pedersen, Owsianik et Nilius, 2005). Les plus connus sont les TRPC, TRPV et TRPM.

Certains de ces canaux sont associés aux sensations, comme le goût (TRPV1). D'autres sont activés par des stimuli thermiques (TRPV2) ou par l'osmolarité (TRPV4). En effet, à des températures au-dessus de 52°C, le canal TRPV2 peut s'activer et agir comme thermocepteur, alors que le canal TRPV4 serait impliqué dans la régulation de la pression osmotique. Ce dernier s'active lorsque le milieu extracellulaire devient hyposmotique afin de retrouver l'équilibre osmotique. Également, le canal TRPM8 peut être activé par le menthol et le froid (Pedersen, Owsianik et Nilius, 2005).

En plus d'être associés à des mécanismes sensitifs, les TRP sont responsables de différentes pathologies. Par exemple, une mutation du gène TRPC6 peut mener à la glomérulosclérose segmentaire focale (Pedersen, Owsianik et Nilius, 2005), alors qu'une délétion du canal TRPV1 serait impliquée dans le syndrome inflammatoire systémique (Fernandes *et al.*, 2012).

Ces canaux sont principalement responsables des mouvements calciques à travers la membrane plasmique. En effet, l'influx de calcium peut être effectué par un grand nombre de ces canaux, soit tous les TRPC et TRPV, TRPM1, 2, 3, 6, 7, 8, TRPA1, TRPP2, 3 et TRPML1, 2 et 3. Certains de ces canaux sont perméables à différents niveaux à d'autres ions comme le magnésium (TRPM6 et TRPM7) et le sodium (TRPM2, 4 et 5) (Pedersen, Owsianik et Nilius, 2005). Ainsi, tous les canaux TRP, sauf TRPV5 et TRPV6 qui sont sélectifs pour le calcium, agissent de façon non sélective face à ces ions et sont dits cationiques non sélectifs (Clapham, Runnels et Strubing, 2001).

Structurellement, les TRP sont formés de 6 hélices transmembranaires permettant la formation d'un pore entre la cinquième et la sixième hélice et laissant les extrémités C et N terminales à l'intérieur de la cellule (Clapham, Runnels et Strubing, 2001) (Figure 1.8). Ces canaux s'associent avec des membres de la même famille en tétramère pour former soit des homotétramères ou des hétérotétramères (Montell, 2005).

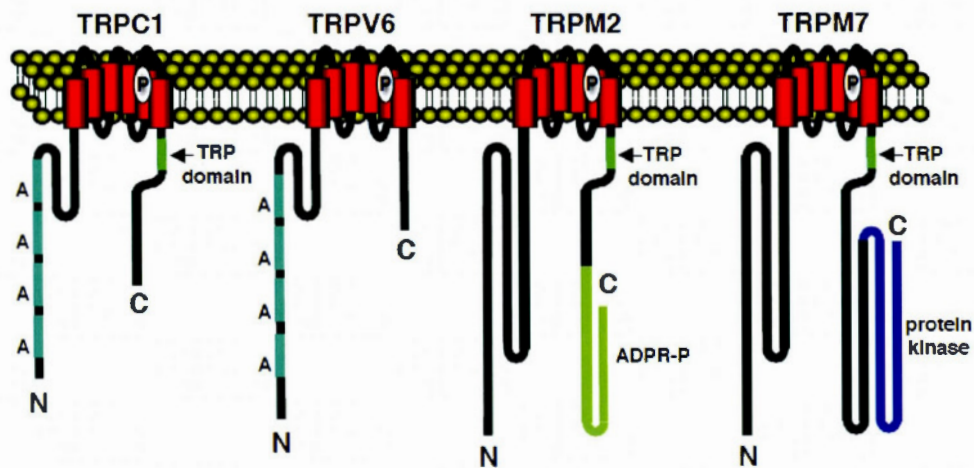


Figure 1.8. Schéma des différentes sous-familles de canaux TRP. Différents domaines fonctionnels sont représentés sur cette figure: répétition ankyrine (A), pore (P), domaine d'ancrage au canal (TRP domain), domaine d'interaction avec la protéine ADP-Ribose hydrolase (vert) et domaine avec activité kinase (bleu). (Tirée de Montell, 2005).

Chapitre 2: Hypothèse et objectifs

L'hormone PTH est à ce jour le seul traitement approuvé par la FDA «Food and Drug Administration» pour le traitement de l'ostéoporose, favorisant une stimulation de la formation osseuse. Les études concernant les effets anaboliques de l'hormone sont toujours en cours, et nécessitent davantage de compréhension concernant les mécanismes moléculaires et les effets engendrés sur la cellule responsable de la formation osseuse, l'ostéoblaste.

Plusieurs de ces études ont identifié différentes protéines ayant un rôle important dans l'effet anabolique véhiculé par des traitements intermittents. En effet, les récepteurs de l'hormone (PTH1/2R) permettent l'induction de l'adénylate cyclase et ainsi la production de l'AMPc. Par contre, chez l'ostéoblaste, l'implication de cette voie de signalisation reste toujours méconnue et doit être développée.

Ainsi, il est émis comme hypothèse que, chez l'ostéoblaste, l'hormone PTH enclencherait une voie de signalisation associée au calcium intracellulaire qui influencerait les fonctions des ostéoblastes.

Le premier objectif était de déterminer l'implication du calcium intracellulaire dans la signalisation intracellulaire associée à une stimulation par la PTH. Le second objectif était d'identifier les canaux calciques responsables de l'influx calcique. Le troisième objectif était d'associer l'effet de la PTH sur le calcium intracellulaire avec la modulation des fonctions ostéoblastiques.

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3.1 Culture cellulaire

Les expériences exécutées au cours de ce projet ont été réalisées avec le modèle cellulaire MG-63 obtenu de « American type culture collection (ATCC, Manassas, USA). Les cellules MG-63 (ostéoblastes provenant d'un ostéosarcome humain) ont été cultivées dans le milieu de culture «Dulbecco's Modified Eagle Medium» (DMEM/F12, Sigma-Aldrich, Oakville, CAN) additionné de 2 mM L-glutamine (Invitrogen, Burlington, Canada), 100 U/mL pénicilline (Invitrogen), 100 µg/mL streptomycine (Invitrogen) et de 10% de sérum bovin fœtal (FBS ; Cansera, Etobicoke, Ontario, Canada). À confluence, les cellules ont été dispersées à l'aide de trypsine-EDTA (0,05%-0,02%) (Invitrogen), etensemencées à raison de 3 000 cellules/cm² dans les différents pêtis ou LabTek (Sarstedt, Montréal, CAN). Les plaques sont alors placées pour un minimum de 5 jours à 37°C, dans un incubateur à 5% CO₂, avec une atmosphère humide contrôlée. Les changements de milieux de culture ont été réalisés tous les deux jours.

3.2 Étude de l'expression génique

Afin de déterminer l'expression génique des récepteurs de la PTH (PTH1R et PTH2R) et des canaux calciques TRPV2 et TRPV4, des amplifications par transcription inverse et réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR) ont été réalisées. L'ARN total des cellules a été extrait avec le TRIzol® Reagent (Invitrogen) selon le protocole du manufacturier. L'ARN obtenu a été quantifié par spectrophotométrie par une lecture des absorbances à 260 et 280 nm. L'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) a ensuite été synthétisé avec 2 µg d'ARN et l'enzyme transcriptase inverse (RT) du kit Omniscript™ RT (Qiagen, Toronto, CAN). Ensuite, une réaction de PCR conventionnelle en utilisant le kit Taq PCR Core (Qiagen) suivant le protocole de la compagnie a été effectuée avec l'utilisation d'amorces spécifiques aux gènes étudiés (Tableau I).

Tableau I. Liste des amorces utilisées.

| Gène | Séquence des amorces | |
|-------------------------------|--|--|
| | Sens | Antisens |
| GAPDH | 5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GTA TTG-3' | 5'-GCT GTA GCC AAA TTC GTT GTC- 3' |
| $\beta\mu$G | 5'-GAC CAG TCA ACA GGG GAC ATA A-3' | 5'-AAG CTT GCG ACC TTG ACC-3' |
| PTH1R | 5'-TGG CGC CAC GCT TGA TGA GG-3' | 5'-GCG TTG GTC TCC CGC AGT TT-3' |
| PTH2R | 5'-CGT GGC TCC GGC GAC AAG AC-3' | 5'-ATG CCC GGA ACG GCT GTA GGA- 3' |
| TRPV2 | 5'-CAA GGG ACT TGG TTT TAT TTC GG-3' | 5'-CAG AAG CCA GGT CAT ACA GCG- 3' |
| TRPV4 | 5'-ACA CCA AGT TTG TTA CCA AGA TGT ACG-3' | 5'-CGA TCA TGA AGA GCA AGT AGA CGA G-3' |

Légende: $\beta\mu$ G; Bêta-microglobuline, GAPDH; glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

Les réactions d'amplification suivaient les cycles de 3 minutes à 94°C pour la dénaturation initiale suivie de 40 cycles comprenant chacun une dénaturation d'une minute à 94°C, une hybridation de 30 secondes à 58°C et une élongation d'une minute à 72°C. Ces cycles ont été suivis d'une élongation finale de 7 minutes à 72°C. L'ADN amplifié a été analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 2% avec un standard de 100 paires de bases (pb) (BioLabs New England, Toronto, CAN), puis la révélation a été effectuée à l'aide du bromure d'éthidium. Les différentes bandes de produits d'amplification PTH1R, PTH2R, TRPV2, TRPV4, β 2-microglobuline et GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) ont été révélées à l'aide d'un transilluminateur UV (2011 Macrovue) et du logiciel AlphaImager (Alpha Innotech, Haguenau, FRA).

3.3 Mesure de calcium intracellulaire

Dans le but d'établir l'implication du calcium dans la signalisation induite par la PTH, des mesures de calcium intracellulaire par microscopie confocale ont été effectuées. Pour ce faire, les cellules MG-63 ont étéensemencées dans des Lab-Tek

(Nalgene Nunc, QC, CAN). Par la suite, les cellules ont été marquées dans une solution tampon saline HEPES (HBSS : 121mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,8 mM MgSO₄, 25 mM HEPES, 1,8 mM CaCl₂ et 6 mM NaHCO₃ à pH 7,3) avec 2 uM de Fluo-acetoxyméthyl (*Molecular Probes, Eugene, OR, USA*) et un volume équivalent à ce dernier de pluronic 127 à 20 % (Life Technologies, Burlington, CAN) durant 45 minutes à 37°C et à la noirceur. Par la suite, les cellules ont été lavées avec le HBSS et laissées à température pièce et à la noirceur durant 45 minutes permettant à la sonde calcique (Fluo-acetoxyméthyl) de se dé-estérifier. Ensuite, le tampon a été retiré et remplacé par un tampon semblable sans calcium. Des mesures de fluorescence, indiquant le niveau de calcium intracellulaire, ont été prises à l'aide d'un microscope confocal (Nikon TE300) à balayage laser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) avec un objectif Apochromatic X40 NA 1.0. La fluorescence a été excitée à 488 nm, et l'émission a été collectée avec un filtre de 515 nm. Ces mesures ont été prises avant le dépôt des différents traitements (explication dans les sections suivantes) afin de mesurer la fluorescence de base. Une fois le traitement ajouté, des mesures ont été faites durant un laps de temps d'environ 100 secondes afin d'observer s'il y a une augmentation de la fluorescence indiquant une mobilisation du calcium provenant du réticulum endoplasmique. Par la suite, du calcium (2,5 mM final) a été ajouté au tampon et des mesures de fluorescence ont été récoltées durant trois minutes afin de mettre en évidence un influx calcique.

3.3.1 Mesure de calcium intracellulaire suite à des traitements stimulant l'influx calcique

Des traitements avec la PTH (1-34) (Bachem Americas, Torrance, CA, USA), le Forskolin (Sigma-Aldrich) (activateur de l'adénylate cyclase) et le PGE₂ (prostaglandine E₂, *Sigma-Aldrich*) (stimulateur de production d'AMPc via EP₂) ont été réalisés dans le cadre de l'étude de mesure de calcium (expliqué au point précédent). Ces traitements ont été ajoutés dans le milieu de culture environ 100

secondes après le début des mesures de calcium. Les concentrations finales (après l'ajout du calcium) sont pour la PTH de 0,5 μM , pour le Forskolin de 5 μM et 10 μM pour le PGE_2 .

Par la suite, des traitements avec l'IBMX (3-isobutyl-1-méthylxanthine) (*Sigma-Aldrich*) (inhibiteur des phosphodiésterases) et le dbAMPc (N(6),2'-O-dibutyryladénosine 3':5' cyclic monophosphate, *Sigma-Aldrich*), qui est analogue de l'AMPc perméable aux membranes cellulaires, mais faiblement métabolisable, ont été réalisés de même manière qu'au point précédent. Trois concentrations ont été utilisées pour chacune de ces deux molécules, soit 125 μM , 300 μM et 500 μM .

Afin de potentialiser l'effet de la PTH, du Forskolin et du PGE_2 concernant l'influx calcique, l'IBMX a été utilisé à une concentration (125 μM) en pré-incubation d'une durée de cinq minutes. Par la suite, les traitements ont été ajoutés et les analyses ont été effectuées de même façon qu'au point 3.3.1.

3.3.2 Effets de différents inhibiteurs sur l'influx calcique induits par la PTH

Afin de caractériser l'influx calcique activé par la PTH, des inhibiteurs des différents types de canaux pouvant faire entrer le calcium à l'intérieure de la cellule ont été utilisés. Le nifédipine (*Sigma-Aldrich*), est un inhibiteur des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC), le gadolinium (*Sigma-Aldrich*), un inhibiteur des canaux TRPC et le rouge de Ruthénium (*Sigma-Aldrich*) qui est un inhibiteur des canaux TRPV ont été utilisés à des concentrations de 10 μM , 25 μM et 10 μM respectivement. Chacun des inhibiteurs est pré-incubé en présence de l'IBMX pour une durée de cinq minutes. Ensuite l'hormone PTH est ajoutée suivant la même procédure expliquée en 3.3.1.

Après avoir identifié les canaux TRPV présents chez les cellules MG-63, d'autres mesures de calcium intracellulaire ont été effectuées avec l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des canaux TRPV2, le Tranilast (Tocris, Bristol, United Kingdom) et TRPV4, le RN-1734 (Tocris). Ainsi, chacun de ces inhibiteurs a été pré-incubé cinq minutes avec l'IBMX (125 μ M) à des concentrations de 20 μ M pour le Tranilast et 15 μ M pour le RN-1734. Ensuite, la PTH et le Forskolin ont été ajoutés au milieu suivant la même procédure expliquée en 3.3.1.

Ensuite, afin d'étudier l'implication de la voie de signalisation de la protéine kinase A/AMPC dans l'influx calcique induit par la PTH, l'inhibiteur de la protéine kinase A, le H-89 (Sigma-Aldrich), a été employé et a été pré-incubé en présence de l'IBMX (125 μ M). Par la suite, la PTH, le Forskolin, le PGE₂ et le dbAMPC ont été ajoutés au milieu sans calcium suivant la même procédure expliquée dans les points précédents.

3.4 Dosage de la production d'AMP cyclique chez la lignée MG-63

Dans le but de déterminer le niveau d'AMPC produit par les cellules MG-63 soumises à différents traitements, un dosage direct de type ELISA a été réalisé. Les cellules ont été mises en culture à raison de 3000 cellules/cm² dans des pétris de 60mm². Après cinq jours de culture, les cellules ont été traitées pendant 15 minutes avec la PTH (0,5 μ M), le PGE₂ (10 μ M), le Forskolin (5 μ M), l'IBMX (125 et 500 μ M) et une combinaison de PTH et IBMX (125 μ M). Ensuite les traitements ont été retirés et du HCl (0.1M) a été ajouté afin de lyser les cellules et bloquer l'activité des enzymes phosphodiésterases endogènes afin de stabiliser l'AMPC produite. Le dosage de l'AMPC a été réalisé selon les procédures du kit de la compagnie (Enzo Life Sciences, Brockville, CAN).

3.5 Étude de la migration cellulaire chez les cellules MG-63

Dans le but d'associer l'influx calcique médié par la PTH et le canal TRPV4 à la fonction de migration cellulaire, des essais de migration par recouvrement de surface ont été réalisés à partir de différents traitements. Les cellules ont été mises en culture à raison de 3000 cellules/cm² dans des plaques de 12 puits, et à confluence, des cellules ont été détachées à l'aide d'un embout afin de créer un espace vide en forme de croix. Ensuite, les cellules ont été soumises pendant 18 heures aux différents traitements tels que décrits précédemment. Enfin, une photo a été prise à la fin du traitement de 18 avec un microscope Axiovert Zeiss 200 avec un objectif 2X lié à une caméra CoolSnap. Il est à noter qu'une photo est prise au début du traitement. Concernant les analyses de ces images, le logiciel Image J (National Institute of Health) a été utilisé pour déterminer le pourcentage de recouvrement par les cellules. Ainsi, à partir des deux photos recueillies, la différence d'espace vide entre les temps 0 et 18h a été calculée afin de déterminer le pourcentage de recouvrement.

3.6 Analyses morphologiques des cellules MG-63

Finalement, des analyses morphologiques des filaments d'actine ont été faites pour en observer les différences selon différents traitements. Les cellules MG-63 ont été cultivées dans des lab-Tek de huit puits. Les cellules ont été incubées 18 heures sous les mêmes conditions de traitements qu'au point 3.3.2. Ensuite les cellules ont été fixées avec une solution formaldéhyde (4%) dans un tampon phosphate salin (PBS) durant 10 minutes. Ensuite, les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X-100 (0,1%) dans le PBS pendant trois minutes, puis elles ont été bloquées avec de l'albumine sérique de bovin (BSA) (3%) dans le PBS durant 45 minutes. Les cellules ont été, à ce moment, incubées avec la phalloïdine conjuguée au fluorochrome Alexa Fluor 555 (5 µM) (Invitrogen) additionné d'un volume équivalent de de Pluronic F127 (20%) (Invitrogen) durant 45 minutes à température pièce et à la noirceur. L'étude des filaments d'actine a été réalisée au microscope confocal (Nikon TE300)

à balayage laser (Bio-Rad) avec un objectif Apochromatic X40 NA 1.0. Enfin, la fluorescence a été excitée par un laser d'argon à 555 nm et l'émission fut collectée avec un filtre de 565 nm.

3.7 Analyse des résultats

Concernant l'analyse des résultats, chacune des expérimentations a été réalisée au minimum à trois reprises. Pour procéder aux analyses statistiques, le logiciel GraphPad PRISM version 4 (GraphPad Software, San Diego, California USA) a été utilisé. Ainsi, un test de Student T a été réalisé à partir des résultats obtenus lors des expérimentations. Le seuil de significativité a été fixé à $P < 0,05$.

Chapitre 4 : Présentation des résultats

Les expérimentations réalisées lors de ce projet seront présentées en deux parties. La première partie vise à cibler les canaux calciques impliqués lors de la stimulation des cellules MG-63 avec la PTH. La seconde partie vise à déterminer l'effet de la stimulation hormonale sur les fonctions cellulaires ostéoblastiques importantes.

4.1. Expression génique des récepteurs de la PTH

Afin de déterminer l'aptitude des cellules à répondre à une stimulation par la PTH, nous avons d'abord déterminé l'expression des récepteurs de l'hormone PTH retrouvés chez les cellules ostéoblastiques MG-63. Des analyses de l'expression génique pour les récepteurs PTH1 (PTH1R) et PTH2 (PTH2R) ont été réalisées par amplification RT-PCR. À la figure 4.1, il est possible d'observer la présence de bandes correspondant à de l'ADN amplifié par PCR en présence des amorces spécifiques pour le gène de référence GAPDH et PTH2R. Selon les informations disponibles dans la banque de données GenBank, la taille attendue des produits d'amplification avec les amorces utilisées est de 934 bp pour GAPDH et de 176 pb pour PTH2R. Selon le profil de migration présenté à la figure 4.1, les bandes obtenues pour GAPDH et PTH2R présentent les tailles attendues. Par contre, aucune bande n'est visible à la figure 4.1 pour la condition où les amorces spécifiques pour PTH1R ont été utilisées.

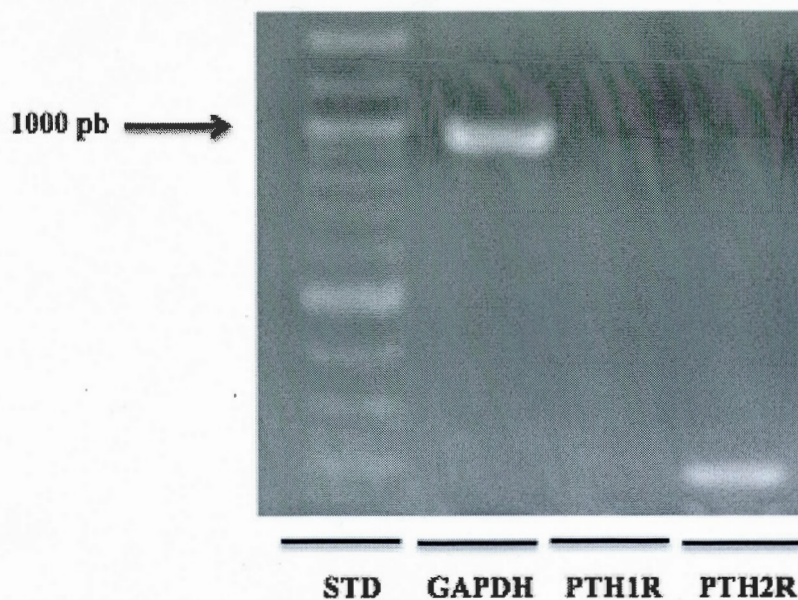


Figure 4.1: Expression génique des récepteurs de la PTH chez les cellules ostéoblastiques MG-63. L'ARN isolé des cellules MG-63 a servi à la synthèse de l'ADN complémentaire. Les différentes séquences correspondant à l'ARNm des gènes PTH1R, PTH2R et GAPDH ont été amplifiées par RT-PCR grâce à des amorces spécifiques. La taille attendue des produits PCR pour GAPDH, PTH1R et PTH2R sont respectivement de 934, 443 et 176 pb. Cette figure est représentative d'expériences effectuées à partir de trois préparations différentes d'ARNm. STD : standard de 100 pb.

4.2. Analyses de l'influx calcique induit par la PTH

Puisque nos résultats indiquent que les cellules MG-63 expriment le récepteur PTH2R (figure 4.1), des analyses de l'influx calcique ont été effectuées par des mesures de calcium intracellulaire pour caractériser l'action de la PTH afin d'observer s'il y a une stimulation d'une mobilisation et/ou d'un influx calcique. Ainsi, les cellules MG-63 reposaient dans un milieu sans calcium et après quelques secondes de mesure de calcium intracellulaire, la PTH, le Forskolin et le PGE₂ ont été ajoutés dans le milieu (respectivement figure 4.2A-B-C). Le Forskolin est utilisé afin d'activer directement l'AC et le PGE₂ permet d'activer la sous-unité G_{α_s} de son récepteur menant tous deux à une augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaire. Ensuite, d'autres mesures ont été prises (durant environ 100

secondes) afin d'observer une augmentation de la fluorescence reflétant une mobilisation du calcium provenant du réticulum endoplasmique. Suite à cela, du calcium a été additionné dans le milieu permettant d'observer s'il y a une stimulation d'un influx calcique. Alors, tel que démontré à la figure 4.2A, la PTH n'amène aucune mobilisation suite à sont ajout dans le milieu, et ensuite, seulement un faible influx calcique est observable lors de l'ajout de calcium. Quant au Forskolin (figure 4.2B), il y a également absence de mobilisation du RE ainsi qu'un faible influx calcique. Enfin, le PGE₂ (figure 4.2C), ne stimule pas la mobilisation du RE et permet, semblablement aux deux autres molécules, qu'un faible influx calcique.

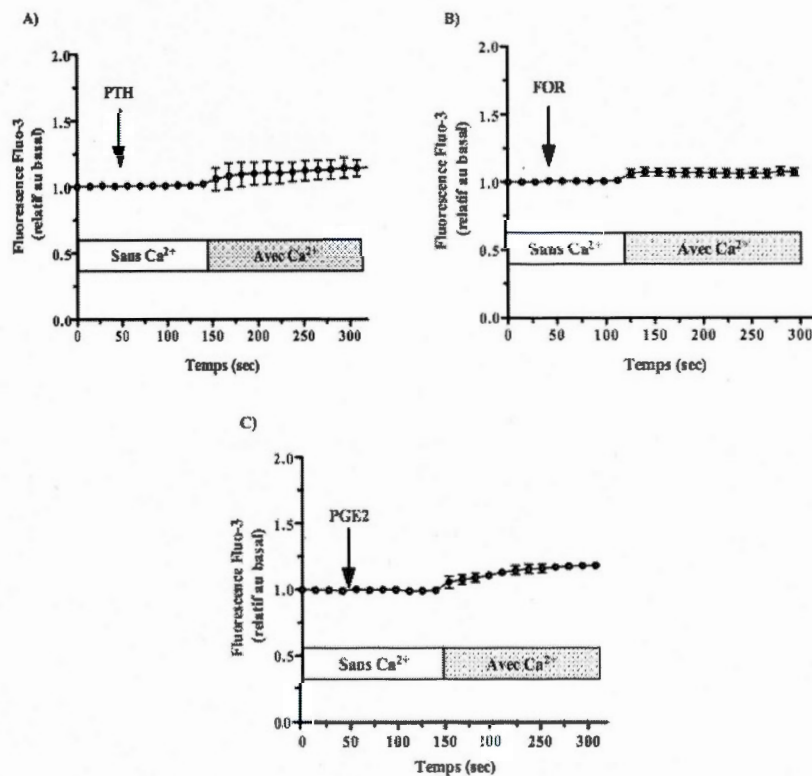


Figure 4.2 : Effet de la PTH, du Forskolin et du PGE₂ sur les niveaux de calcium intracellulaire. Les cellules ostéoblastiques MG-63 ont été marquées avec le fluo-3. Ensuite, les cellules ont été transférées dans un milieu sans calcium. Les mesures intracellulaires ont été réalisées au microscope confocal. Les différents traitements avec (A) la PTH (0,5 μ M), (B) le Forskolin (5 μ M) et (C) le PGE₂ (10 μ M) ont été ajoutés dans un milieu sans calcium. Par la suite, du calcium (2,5 mM final) a été ajouté au milieu afin de déterminer l'influx calcique. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD provenant de trois expériences indépendantes.

4.3 Effet du dbAMPc et IBMX sur l'influx calcique chez la lignée MG-63

À la lumière des résultats présentés à la figure précédente, les différents traitements ne présentent pas un effet distinct sur l'influx calcique chez les cellules MG-63. En raison que cette hormone est reconnue pour activer la voie de signalisation impliquant AMPc/PKC, nous avons effectué de nouvelles expériences en utilisant le dbAMPc, un analogue faiblement métabolisable de l'AMPc, et l'IBMX, un inhibiteur des phosphodiésterases. Selon les résultats présentés à la figure 4.3A, à une concentration de 125 μ M, le dbAMPc induit la stimulation d'un influx calcique dans les cellules MG-63. De plus, l'amplitude de l'influx calcique augmente en fonction de concentrations croissantes de dbAMPc (figure 4.3B et C). Par ailleurs, une concentration de 125 μ M d'IBMX ne provoque pas d'influx calcique (Figure 4.3D). Toutefois, des concentrations plus élevées d'IBMX amènent un influx calcique, qui est à nouveau plus important lorsque la concentration d'IBMX augmente (Figures 4.3D et E).

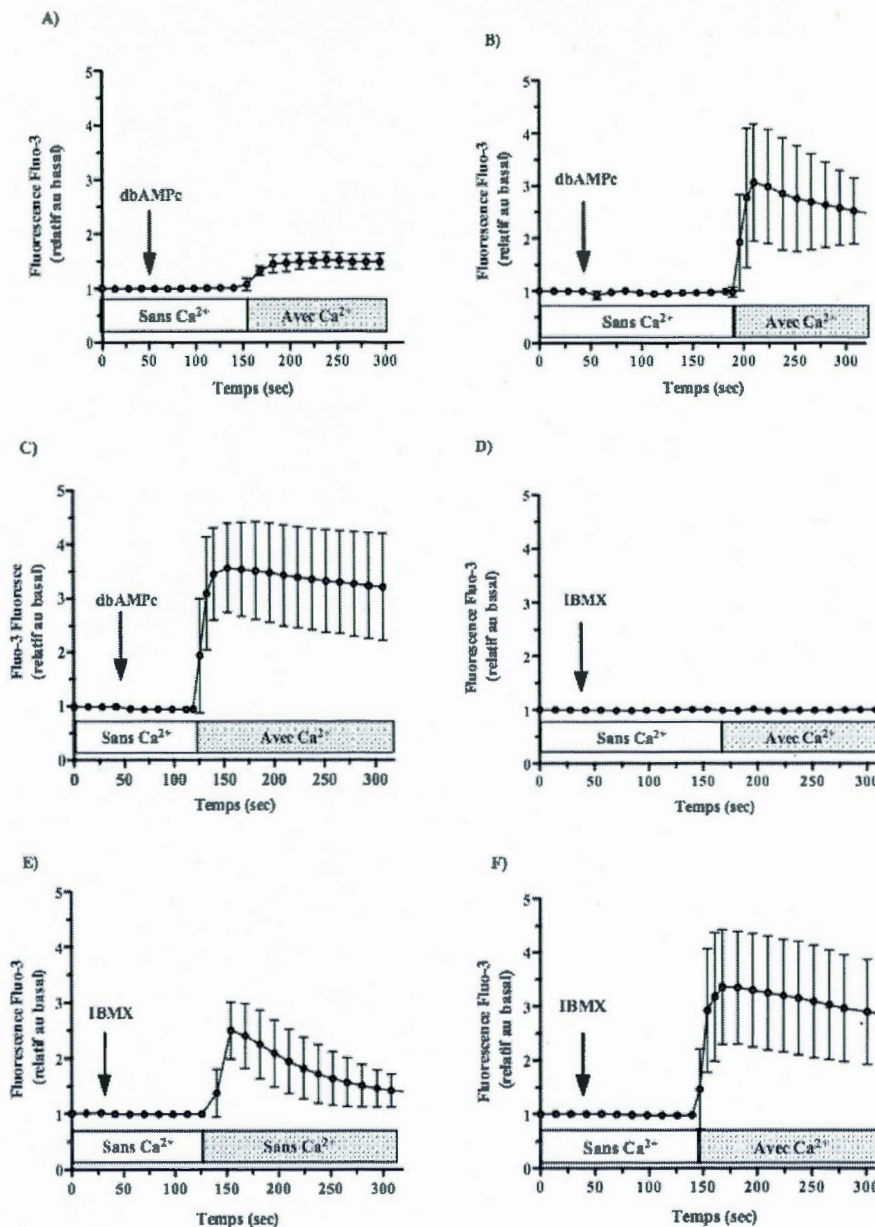


Figure 4.3 : Effet du dbAMPc et du IBMX sur les niveaux de calcium intracellulaire. Les cellules ostéoblastiques MG-63 ont été marquées avec le fluo-3. Ensuite, les cellules ont été transférées dans un milieu sans calcium. Les mesures intracellulaires ont été réalisées au microscope confocal. Les différents traitements avec (A, B, C) le dbAMPc (respectivement 125 μ M, 300 μ M et 500 μ M) et (D, E, F) le IBMX (respectivement 125 μ M, 300 μ M et 500 μ M) ont été ajoutés dans un milieu sans calcium. Par la suite, du calcium (2,5 mM final) a été ajouté au milieu afin de déterminer l'influx calcique. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD provenant de trois expériences indépendantes.

4.4 Effet de l'IBMX sur l'influx calcique médié par PTH

Selon la figure 4.2, l'hormone PTH n'amène qu'un très faible influx calcique. Ainsi, nous avons tenté de potentialiser l'effet de l'hormone en utilisant l'IBMX à une concentration de 125 μ M, une condition ne conduisant pas seule à un influx calcique (Figure 4.3D). La raison pour laquelle l'IBMX est utilisé c'est afin de diminuer la possibilité de dégradation de l'AMPc produite par la PTH, et ainsi maintenir une concentration élevée à l'intérieur de la cellule. Ainsi, une pré-incubation des cellules MG-63 a été réalisée avec l'IBMX d'une durée d'environ cinq minutes dans un milieu sans calcium. Tel que présenté à la figure 4.4, pour la condition PTH, il y a stimulation d'un influx calcique lors de l'ajout de calcium dans le milieu à raison d'une augmentation de 1.5 fois la fluorescence relative à celle en condition basale lorsque les cellules MG-63 sont pré-incubées avec l'IBMX. Concernant le Forskolin, un influx calcique est également détecté à un taux semblable à celui engendré par la PTH. Enfin, pour la condition avec PGE₂, un influx calcique est également observé, par contre, le taux auquel il s'élève grimpe à trois fois par rapport en condition basale.

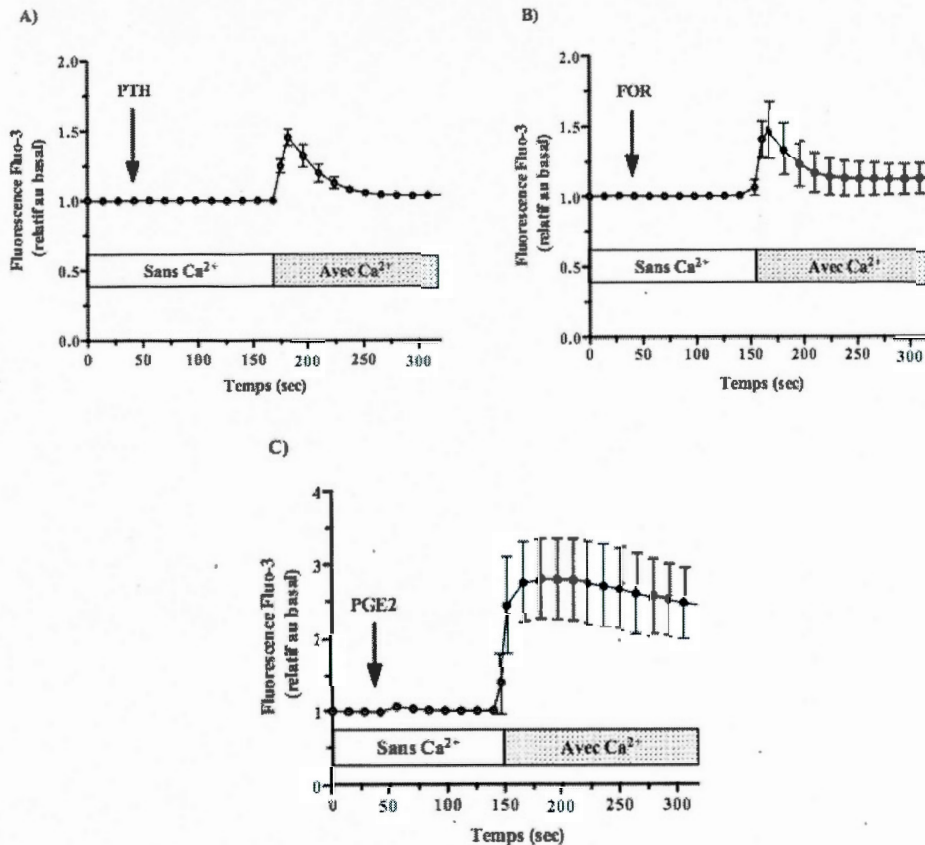


Figure 4.4: Potentialisation par l'IBMX de l'effet de la PTH, du Forskolin et du PGE₂ sur les niveaux de calcium intracellulaire. Les cellules ostéoblastiques MG-63 ont été marquées avec le fluo-3. Ensuite, les cellules ont été transférées dans un milieu sans calcium. Les mesures intracellulaires ont été réalisées au microscope confocal. Une pré-incubation de cinq minutes des cellules a été réalisée avec l'IBMX (125 μ M). Les différentes substances telles (A) la PTH (0,5 μ M), (B) le Forskolin (5 μ M) et (C) le PGE₂ (10 μ M) ont été ajoutées dans un milieu sans calcium. Par la suite, du calcium (2,5 mM final) a été ajouté au milieu afin de déterminer l'influx calcique. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD provenant de trois expériences indépendantes.

4.5 Identification des canaux impliqués dans l'influx calcique induit par la PTH

Après avoir déterminé qu'une pré-incubation de quelques minutes avec l'IBMX permettait à la PTH de produire un influx calcique, chez les cellules MG-63, nous avons réalisé des expériences afin d'identifier quels sont les canaux responsables de cet influx. Pour ce faire, différents inhibiteurs de canaux cationiques

ont été utilisés : un inhibiteur des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC), la nifédipine; un inhibiteur des canaux TRPC, le gadolinium; un inhibiteur des canaux TRPV, le rouge de ruthénium. Pour la suite des expériences, les cellules ont été pré-incubées en présence de l'IBMX dans un milieu sans calcium afin de potentialiser la stimulation de l'influx calcique tel que montré à la figure 4.4. Par la suite la PTH a été ajoutée et après un certain moment d'incubation (environ 100 secondes), le calcium est ajouté au milieu d'incubation. Tel que présenté à la figure 4.5, un influx calcique induit par la PTH est observé lorsque les cellules sont préincubées avec la nifédipine (figure 4.5A) ou avec le gadolinium (figure 4.5B). Par contre, suite à une préincubation des cellules avec l'inhibiteur rouge de ruthénium, aucune augmentation de la fluorescence n'est obtenue (figure 4.5C), indiquant ainsi que le rouge de ruthénium inhibe les canaux responsables de l'influx induit par la PTH.

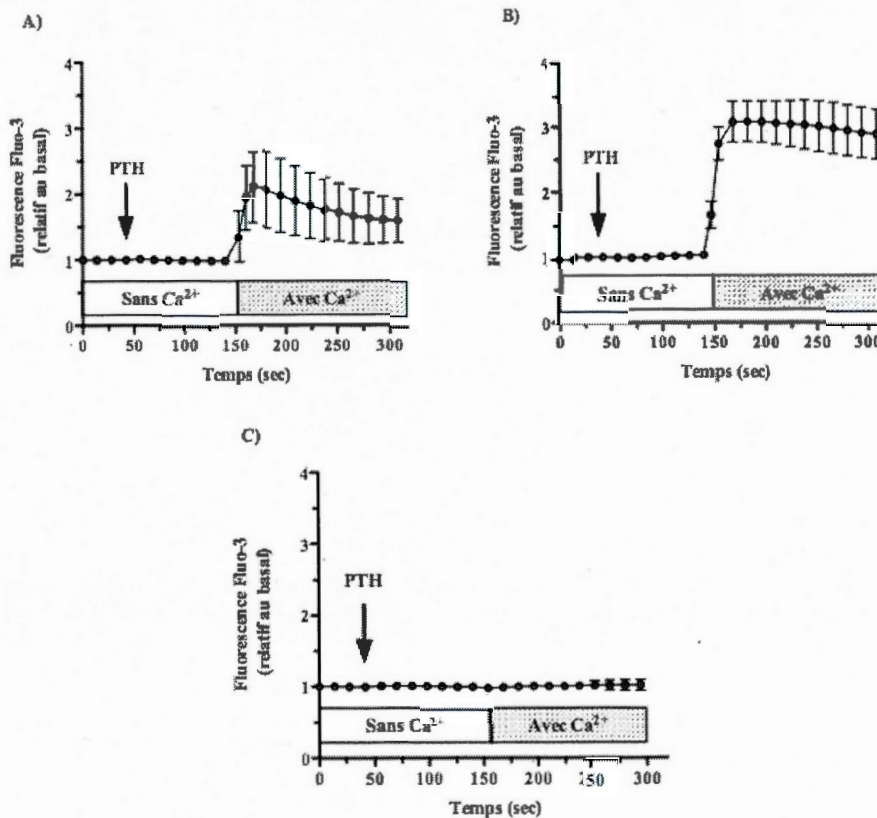


Figure 4.5 : Effets de différents inhibiteurs de canaux cationiques sur l'influx calcique induit par la PTH. Les cellules ostéoblastiques MG-63 ont été marquées avec le fluo-3. Ensuite, les cellules ont été transférées dans un milieu sans calcium et pré-incubées avec l'IBMX (125 μ M) en présence de différents inhibiteurs de canaux cationiques tels (A) la Nifédipine (10 μ M), (B) le Gadolinium (25 μ M) et (C) le rouge de ruthénium (10 μ M). Les mesures intracellulaires ont été réalisées au microscope confocal. La PTH (0,5 μ M) a été ajoutée au milieu et ensuite du calcium a été ajouté afin de déterminer l'influx calcique. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD provenant de trois expériences indépendantes

4.6 Expression des canaux TRPV chez la lignée ostéoblastique MG-63

Les résultats présentés à la figure précédente indiquent que la PTH induit l'activation de canaux TRPV, responsables de l'influx calcique. Nous voulions donc, en second lieu, identifier quels membres de la famille des canaux TRPV sont

exprimés par les cellules MG-63. Tel que démontré à la figure 4.6, il est possible de remarquer la présence de bandes d'amplicons pour le gène de référence β -microglobuline (β ug) et les gènes TRPV2 et TRPV4. À partir des informations de la banque de données GenBank, la taille attendue du produit d'amplification selon les amorces utilisées est de 176 pb pour β ug, 432 pour TRPV2 et 866 pb pour TRPV4. De plus, il est possible d'observer un variant du TRPV4 qui se situe à 686pb. Donc, à partir du profil de migration observé à la figure 4.6, les bandes obtenues se situent à la taille correspondante attendue. Il est important de rappeler que les autres membres des TRPV n'ont pas été étudiés étant donné qu'une étude antérieure réalisée au laboratoire démontrait que seulement TRPV2 et TRPV4 sont exprimés par les ostéoblastes (Abed *et al.*, 2009).

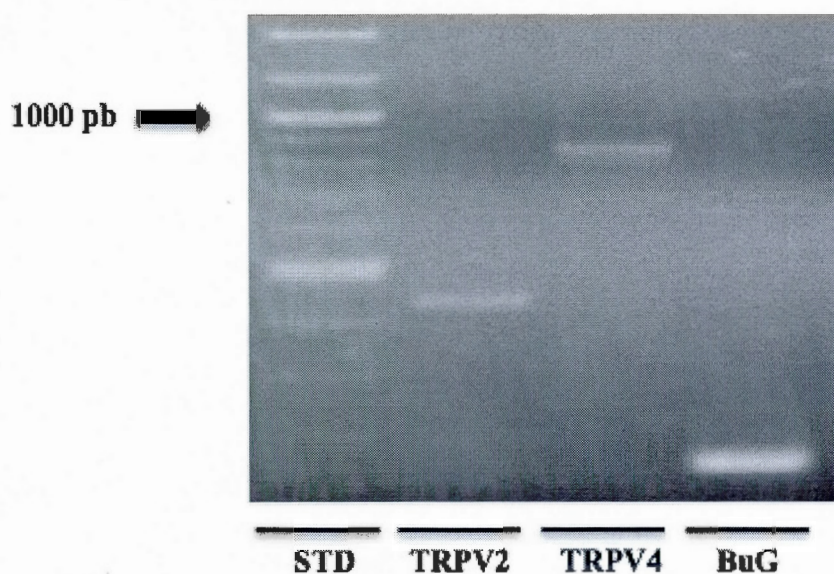


Figure 4.6: Expression génique des canaux TRPV2 et TRPV4 chez les cellules ostéoblastiques MG-63. L'ARN isolé des cellules MG-63 a servi à la synthèse de l'ADN complémentaire. Les différentes séquences correspondant à l'ARNm des gènes TRPV2, TRPV4 et β -microglobuline (BuG) ont été amplifiées par RT-PCR grâce à des amorces spécifiques. Les tailles attendues des produits de PCR pour TRPV2 et TRPV4 sont respectivement de 432 et 866 pb. De plus, la présence de l'ARNm d'un variant du TRPV4 peut mener à l'amplification d'un ADN de 686 pb. Cette figure est représentative d'expériences effectuées à partir de trois préparations différentes d'ARNm. STD : standard de 100 Bp.

4.7 Identification du canal TRPV responsable de l'influx calcique induit par PTH

Afin d'identifier quel type de canal TRPV est responsable de l'influx induit par la PTH, des inhibiteurs sélectifs pour le canal TRPV2 (Tranilast) et pour le canal TRPV4 (RN-1734) ont été utilisés. Selon la figure 4.7 un influx calcique induit par la PTH (figure 4.7 A) ou le Forskolin (figure 4.7B) est observé (fluorescence s'élevant à plus de deux fois par rapport en condition basale) suite à une pré-incubation avec l'IBMX et le Tranilast. Par contre, suite à une pré-incubation avec le RN-1734, aucun influx calcique n'est observé suite à l'ajout de PTH (figure 4.7C) ou de Forskolin (figure 4.7D).

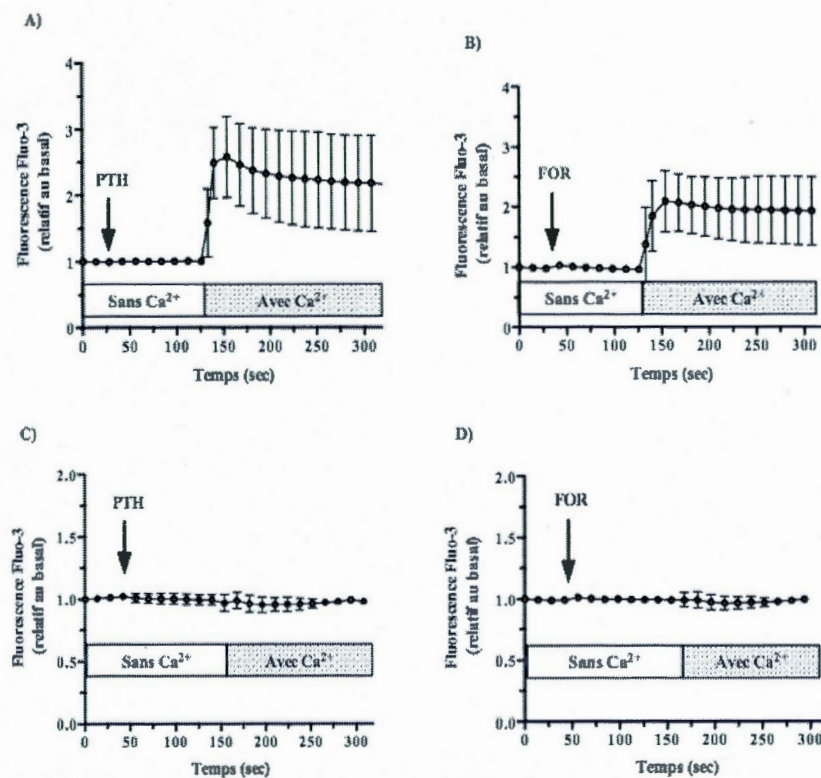


Figure 4.7 : Effet des inhibiteurs de canaux TRPV2 (Tranilast) et TRPV4 (RN-1734) sur l'influx calcique induit par la PTH et le Forskolin. Les cellules ostéoblastiques MG-63 ont été marquées avec le fluo-3. Ensuite, les cellules ont été transférées dans un milieu sans calcium et pré-incubées avec l'IBMX (125 μ M) en présence de différents inhibiteurs de canaux TRPV, Tranilast (20 μ M) (A,B) et RN 1734 (15 μ M) (C, D). Les mesures intracellulaires ont été réalisées au microscope confocal. La PTH et le Forskolin ont été ajoutés au milieu et ensuite du calcium a été ajouté afin de déterminer l'influx calcique. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD provenant de trois expériences indépendantes.

4.8 Implication de la protéine kinase A dans l'influx calcique induit par la PTH

Afin de connaître davantage le mécanisme de signalisation régissant l'activation de l'influx calcique par la voie AMPc, nous avons utilisé un inhibiteur de la protéine kinase A, le H-89. Les cellules MG-63 ont été pré-incubées dans un milieu sans calcium avec l'IBMX afin de potentialiser l'activation de l'influx calcique en présence ou non de H-89 pendant cinq minutes afin d'inhiber la protéine kinase A. Suite à l'ajout de la PTH (figure 4.8A) et du calcium dans le milieu, il est possible d'observer que lorsque les cellules sont pré-incubées avec le H-89 et l'IBMX, il n'y a pas d'influx calcique détecté comparativement à la condition sans H-89. Concernant le Forskolin (figure 4.8B), il est possible d'observer le même effet du H-89. Quant au PGE_2 (figure 4.8C) son action seule stimulait un fort influx calcique. Par contre le H-89 parvient également à bloquer cet influx. Finalement, l'influx véhiculé par le dbAMPc (figure 4.8D) est bloqué comme les trois autres molécules par l'inhibiteur de la protéine kinase A.

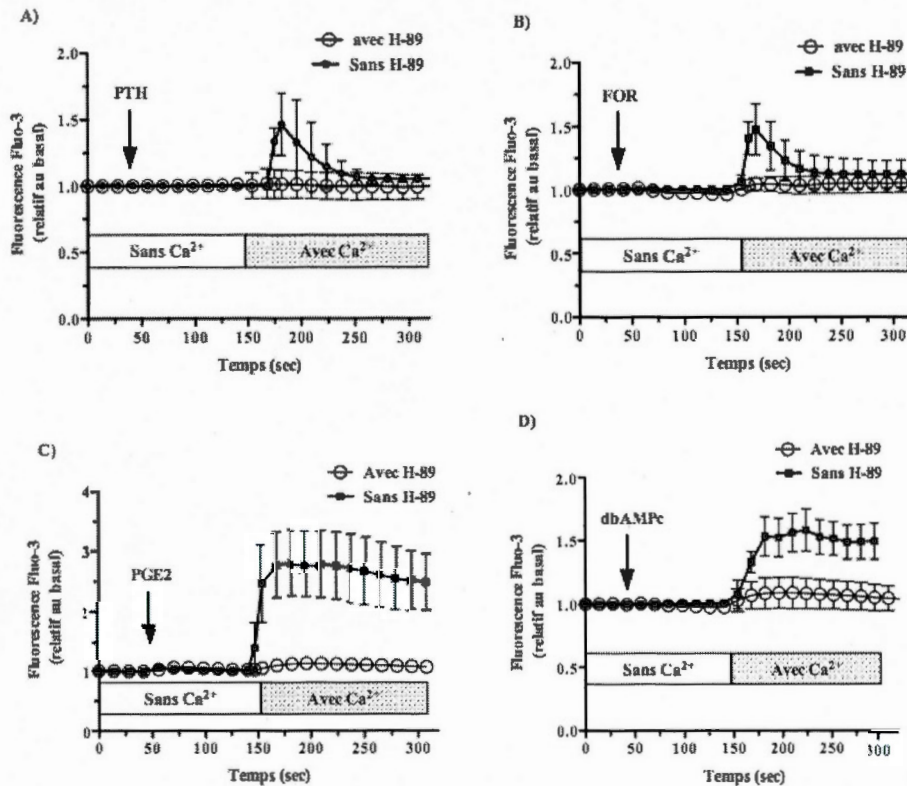


Figure 4.8 : Effet de l'inhibiteur de PKA sur l'influx calcique induit par la PTH, le Forskolin, le PGE₂ et le dbAMPc. Les cellules ostéoblastiques MG-63 ont été marquées avec le fluo-3. Ensuite, les cellules ont été transférées dans un milieu sans calcium et pré-incubées avec l'IBMX (125 μ M) (excepté pour le traitement dbAMPc) en présence de l'inhibiteur de PKA (H-89, 10 μ M). Les mesures intracellulaires ont été réalisées au microscope confocal. (A) La PTH (0,5 μ M), (B) le Forskolin (5 μ M), (C) le PGE₂ (10 μ M), et (D) le dbAMPc (125 μ M) ont été ajoutés au milieu et ensuite du calcium a été ajouté afin de déterminer l'influx calcique. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm SD provenant de trois expériences indépendantes.

4.9 Production d'AMPc par les cellules ostéoblastiques MG-63 suite à différents traitements.

Le dernier résultat obtenu à la figure 4.8 suggère l'implication de l'AMPc dans l'activation du canal TRPV4 afin de générer un influx calcique suite à la stimulation par la PTH. Il est donc nécessaire de déterminer le taux de production d'AMPc suite aux traitements PTH, IBMX, Forskolin, PGE₂ et une combinaison

IBMX et PTH. Premièrement, selon le tableau II, il est possible de remarquer que la PTH ne stimule pas la production d'AMPc comparativement à la condition contrôle. Pour sa part, le PGE2 stimule la synthèse d'AMPc de plus de 28X comparé à la condition contrôle. De plus, les traitements des cellules MG-63 avec l'IBMX entraînent une production croissante d'AMPc (Tableau III). La combinaison de traitements PTH et IBMX (125 uM) amène une production supérieure à celle lorsque ces deux molécules sont utilisées seul. Enfin, le Forskolin amène une production d'AMPc 28X supérieure à celle de la condition contrôle.

Tableau II. Dosage des niveaux d'AMPc relatifs au contrôle chez les cellules MG-63 suite à un traitement PTH et PGE₂.

| CTL | PTH | PGE ₂ |
|-------------|-------------|------------------|
| | 5 µM | 10 µM |
| 1,00 ± 0,20 | 0,96 ± 0,15 | 28,71 ± 13,64 ** |

Légende : Les cellules MG-63 ont été traitées durant 15 minutes avec la PTH et le PGE₂. Les niveaux d'AMPc ont été dosés par un dosage colorimétrique en ELISA (trousse de la compagnie Enzo). Les valeurs relatives au contrôle sont exprimées en moyenne ± SD de trois expériences indépendantes. La valeur absolue de la condition contrôle (CTL) étaient de 79,32 ± 30,74 pmol/ml. Les analyses statistiques sont effectuées par le test T de Student en comparaison à la condition contrôle. **P<0.01

Tableau III. Dosage des niveaux d'AMPc relatif au contrôle chez les cellules MG-63 suite à des traitements avec IBMX, Forskolin et une combinaison IBMX et PTH.

| CTL | IBMX | IBMX | Forskolin | PTH + IBMX |
|-------------|----------------|-----------------|------------------|----------------|
| | 125 µM | 500 µM | 5 µM | 5 µM et 125 uM |
| 1,00 ± 0,20 | 1,53 ± 0,09 ** | 2,88 ± 0,48 *** | 28,71 ± 13,64 ** | 3,20 ± 1,23 * |

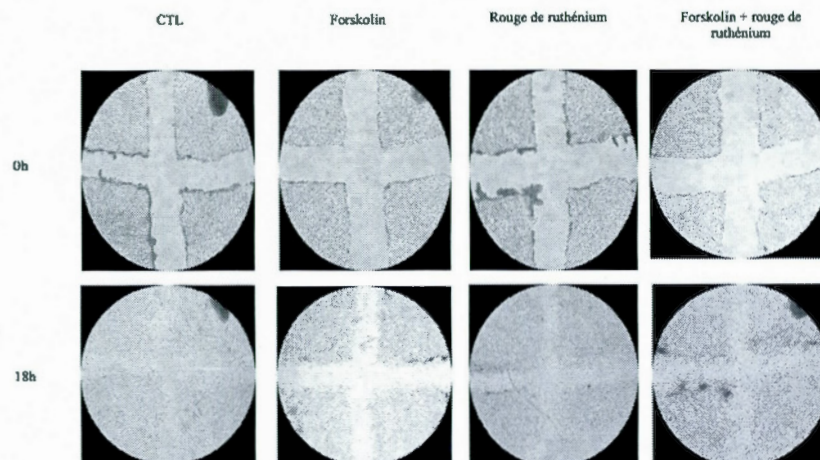
Légende : Les cellules MG-63 ont été traitées durant 15 minutes avec l'IBMX, le Forskolin et en combinaison PTH et IBMX. Les niveaux d'AMPc ont été dosés par un dosage colorimétrique en ELISA (trousse de la compagnie Enzo). Les valeurs relatives au contrôle sont exprimées en moyenne ± SD de trois expériences indépendantes. La valeur absolue de la condition contrôle (CTL) étaient de 79,32 ±

30,74 pmol/ml. Les analyses statistiques sont effectuées par le test T de «Student» en comparaison à la condition contrôle. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

4.10 Étude de la migration cellulaire chez les cellules MG-63

Étant donné qu'il est rapporté dans la littérature que l'AMPc est impliqué dans la migration cellulaire (Howe, 2004) nous avons étudié l'action de la PTH sur cette fonction cellulaire. Un essai de migration cellulaire par recouvrement a été réalisé sur une durée de 18 heures. La figure 4.9A montre des images représentatives de la migration cellulaire suite aux différents traitements par rapport au traitement contrôle après 18 heures. Ainsi, il est possible d'observer que, pour le traitement Forskolin, il y a moins de cellules présentes dans l'espace vide, comparativement au traitement contrôle, alors que le rouge de ruthénium et la combinaison de ces deux molécules amène une augmentation du nombre de cellules dans cet espace vide. À partir de ces images, nous avons quantifié numériquement la migration cellulaire. La figure 4.9B démontre que la PTH, et davantage le Forskolin, entraînent une diminution du pourcentage de recouvrement par les cellules de 25% et 55% respectivement, indiquant une diminution de la migration cellulaire. Tel que présenté à la figure 4.9B, les traitements avec les inhibiteurs rouge de ruthénium et RN-1734 démontrent stimulation de la migration. D'autre part, les combinaisons de la PTH avec ces inhibiteurs lèvent l'inhibition de la PTH. Il est possible de remarquer ce même effet de renversement d'inhibition par le Forskolin lorsque ce dernier est en combinaison avec les deux inhibiteurs rouge de ruthénium et RN-1734. Enfin, l'inhibiteur de la protéine kinase A (H-89) utilisé seul entraîne également une augmentation de la migration. De plus, la combinaison de cet inhibiteur avec la PTH et le Forskolin lève aussi l'inhibition engendrée par ces deux molécules.

A)



B)

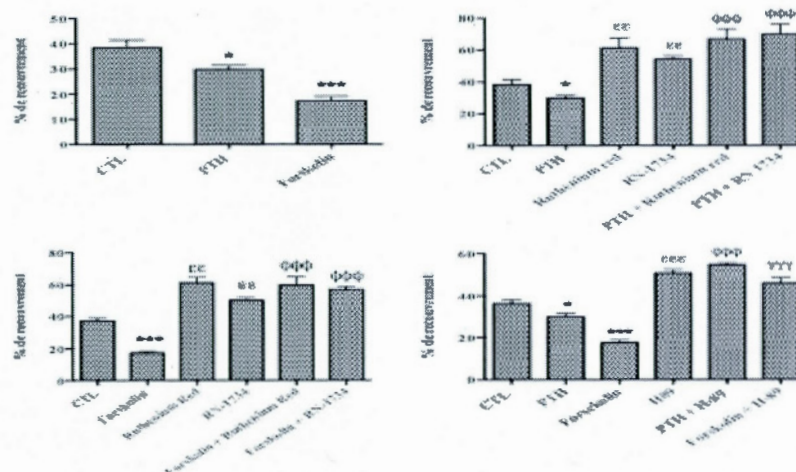


Figure 4.9 : Effets de la PTH, Forskolin, des inhibiteurs rouge de Ruthénium, RN-1734, H-89, et les combinaisons de la PTH et Forskolin avec ces inhibiteurs sur la migration cellulaire. Préalablement, les cellules MG-63 ont été détachées afin de former un espace vide en forme de croix. Les différents traitements, soit PTH, Forskolin, des inhibiteurs rouge de Ruthénium, RN-1734, H-89, et les combinaisons de la PTH et Forskolin avec ces inhibiteurs ont été réalisés pour une durée de 18 heures et une photo a été prise au début et à la fin du traitement (A) afin d'en analyser l'espace qui a été recouvert par les cellules en périphérie de la croix formée au départ. Chaque graphique présente le pourcentage de recouvrement de l'espace libre par les cellules MG-63 après 18 heures de traitement (B). Les analyses statistiques ont été réalisées par un test T de Student : * $P > 0.05$, *** $P > 0.001$, diminution de la migration comparée à la condition contrôle; ^{EE} $P > 0.01$, ^{EE} $P > 0.001$,

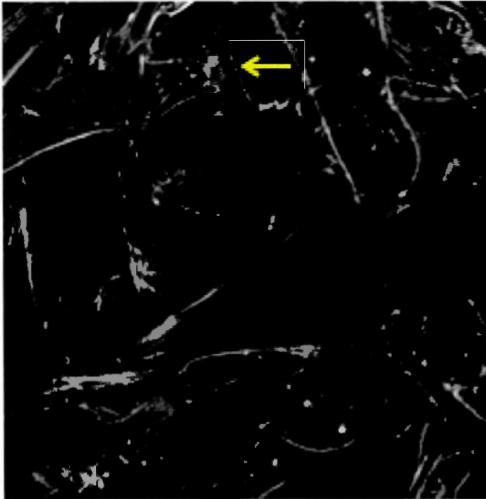
stimulation de la migration comparée à la condition contrôle. $^{***}P > 0,001$, $^{***}P > 0,001$ comparée à la condition sans inhibiteur.

4.11 Analyses morphologiques des cellules MG-63

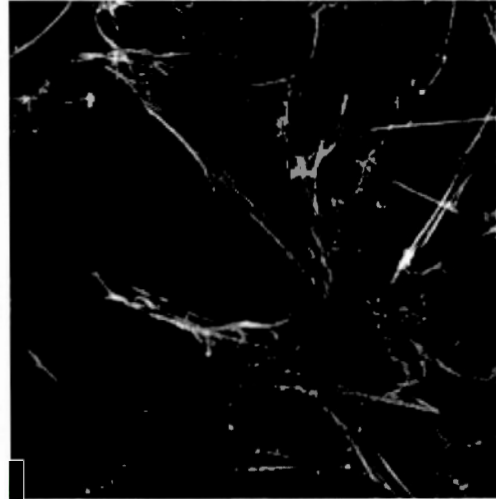
Suite à l'analyse de migration cellulaire, nous avons remarqué que certains traitements, comme le rouge de ruthénium, stimulaient la migration alors que d'autres, comme le Forskolin, l'inhibaient. Ainsi, nous avons effectué une étude de la morphologie de ces cellules suite à ces traitements afin d'observer des modifications de la morphologie cellulaire et de l'arrangement du cytosquelette suite aux traitements. Pour ce faire, un marquage des filaments d'actine cytoplasmique à l'aide de la phalloïdine couplée à un fluorochrome ainsi que des analyses microscopiques ont été réalisés. La figure 4.10 montre que certaines particularités morphologiques apparaissent selon les différents traitements. Pour les traitements avec les inhibiteurs rouge de ruthénium, RN-1734 et le H-89, de fins prolongements cytoplasmiques (flèches jaunes) sont observés. Concernant les traitements avec l'hormone PTH et le Forskolin, ces prolongements sont moins présents comparativement aux traitements avec les inhibiteurs et même que le traitement contrôle. De plus, ces mêmes prolongements se retrouvent dans les traitements combinant PTH ou Forskolin avec les trois inhibiteurs étudiés.

A)

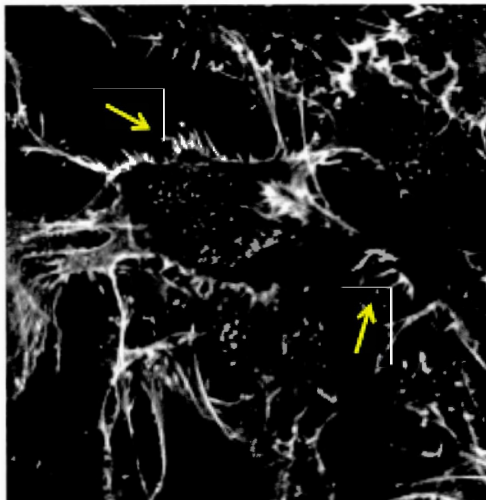
CTL



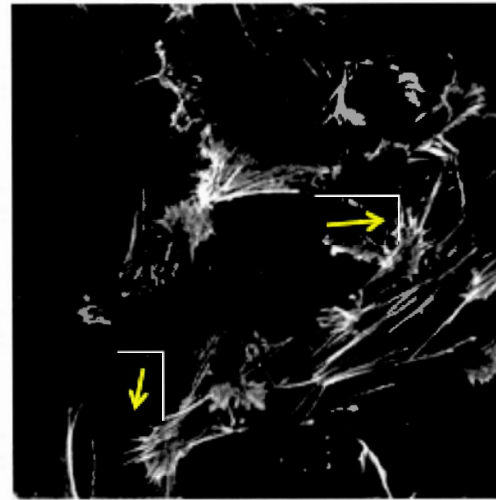
PTH



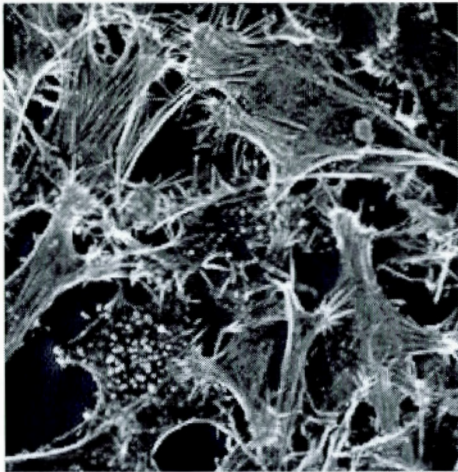
Rouge de Ruthénium



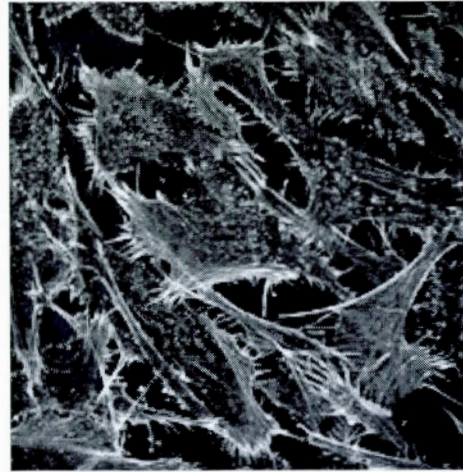
RN-1734



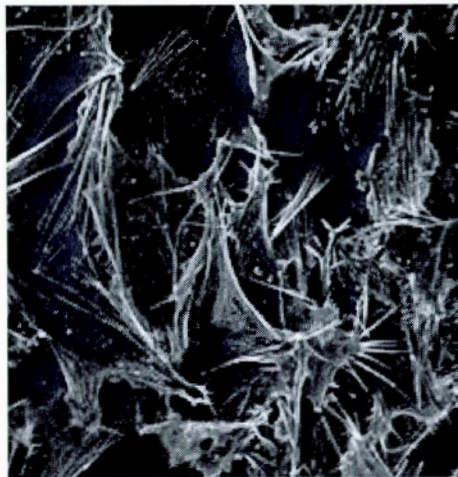
H-89



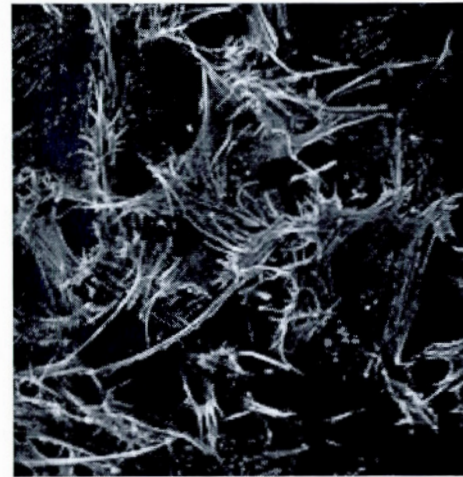
PTH + rouge de Ruthénium



PTH + RN-1734

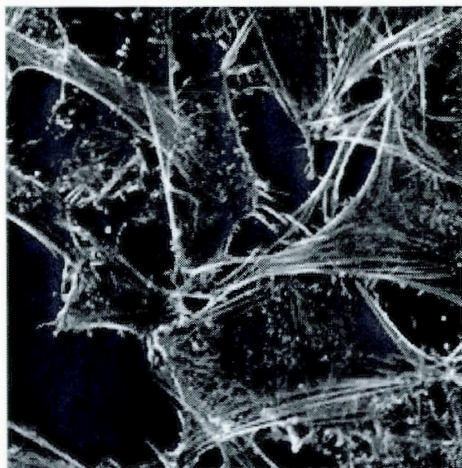


PTH + H-89

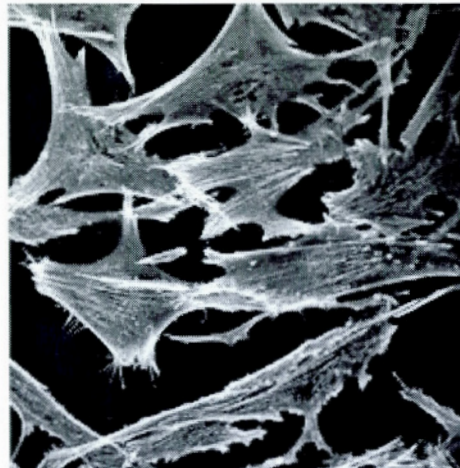


B)

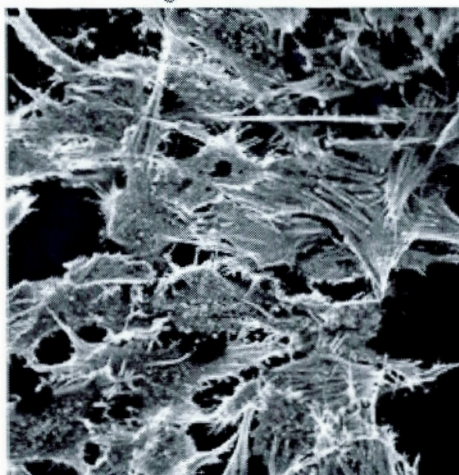
CTL



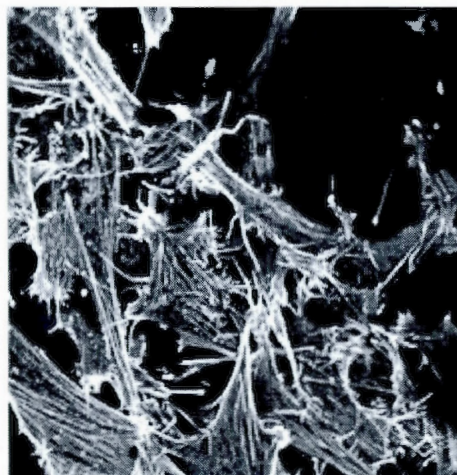
Forskolin



Rouge de Ruthénium



RN-1734



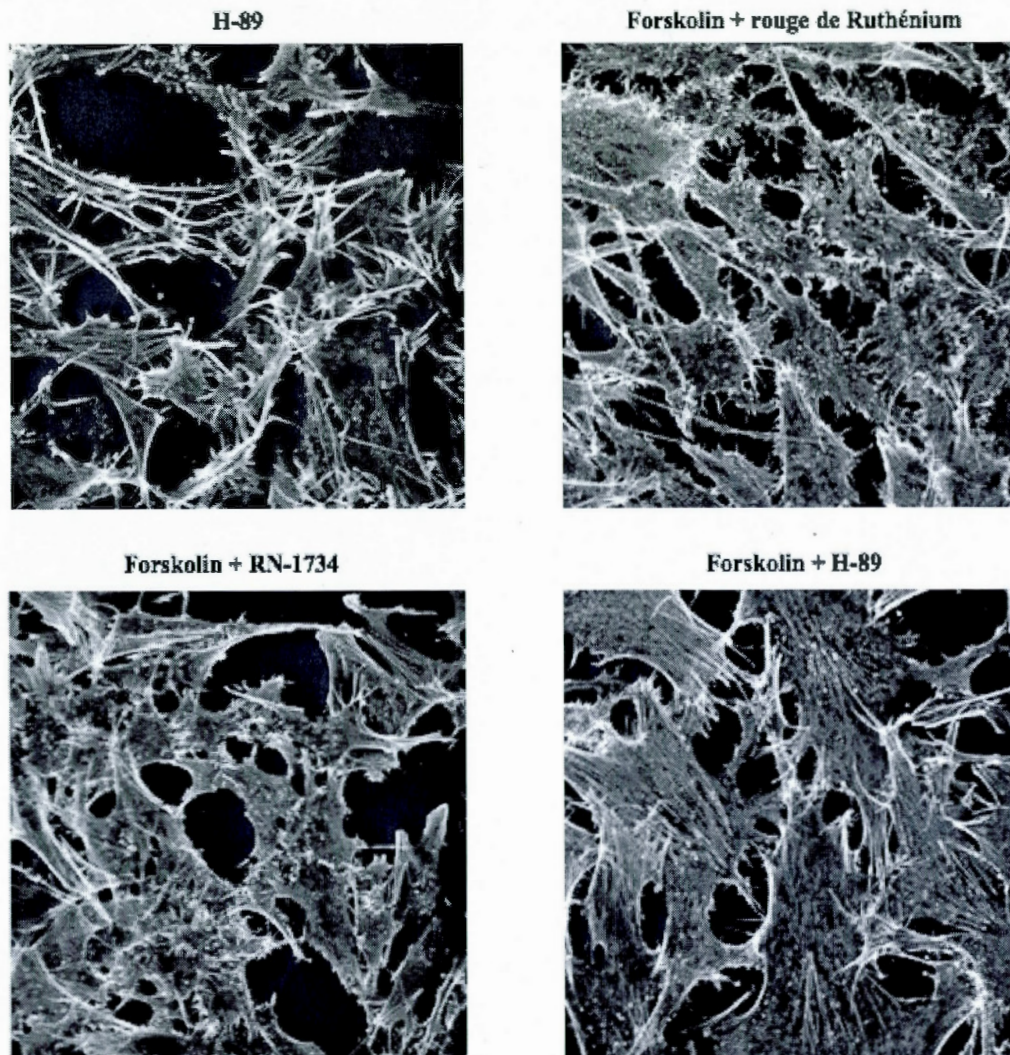


Figure 4.10: Effets de la PTH, Forskolin, des inhibiteurs rouge de Ruthénium, RN-1734, H-89, et les combinaisons de la PTH et Forskolin avec ces inhibiteurs sur la morphologie des cellules MG-63. Les traitements ont été effectués sur une durée de 18 heures avec (A) la PTH (0,5 μM) ou (B) le Forskolin (5 μM), ainsi qu'en présence (A, B) de rouge de ruthénium (10 μM), de RN-1734 (15 μM), de H-89 (10 μM) et des combinaisons de traitements. L'actine du cytosquelette a été marquée à l'aide de la phalloïdine conjuguée à Alexa Fluor-555 et a été visualisée par microscopie fluorescente. La fluorescence a été excitée à 555 nm et fut collectée à l'aide d'un filtre de 565 nm.

Chapitre 5 : Discussion

La signalisation de l'hormone PTH et ses effets chez l'ostéoblaste sont encore méconnus dans la littérature. Également, l'implication du calcium en lien avec une stimulation avec cette hormone nécessite d'être investigué davantage. Ce projet a donc tenté de compléter ce manque de connaissance concernant l'hormone PTH chez l'ostéoblaste dans le but de comprendre les mécanismes thérapeutiques par l'hormone PTH.

5.1 Expression génique des récepteurs de la PTH

Afin d'étudier l'activité de l'hormone PTH sur les cellules MG-63, nous avons vérifié l'expression génique des récepteurs PTH1R et PTH2R de ces cellules. Selon la figure 4.1, seulement le récepteur PTH2R est exprimé par les cellules ostéoblastiques MG-63. Par contre, de nombreuses études ont rapporté l'expression de PTH1R par les ostéoblastes (Datta *et al.*, 2010 ; Rey *et al.*, 2006 ; Schluter, 1999). Ainsi, deux possibilités pourraient expliquer ce résultat, soit que les amorces utilisées en PCR pour le PTH1R ne sont pas fonctionnelles ou bien que les cellules MG-63 n'expriment tout simplement pas le récepteur PTH1R. Il est rapporté que cette lignée cellulaire exprime le PTH1R, mais le niveau d'expression serait très faible en raison du phénotype d'ostéoblaste peu différencié (Baird *et al.*, 2005). En effet, l'expression et l'activité du PTH1R sont plus importantes chez les ostéoblastes différenciés matures (Suda *et al.*, 1996). En somme, on ne peut pas stipuler officiellement que ces cellules n'expriment pas le PTH1R. Il serait donc intéressant de faire des analyses avec une lignée cellulaire ostéoblastique reconnue pour exprimer le récepteur à un niveau plus important. Concernant le PTH2R, la littérature démontre peu de certitude quant à son expression ailleurs que dans le cerveau, le pancréas et le muscle. Or, nous obtenons une bande correspondante à ce récepteur, et ce, à maintes reprises et pour différents passages (données non

présentées). À la lumière de ce résultat, il est possible de supposer que ce récepteur serait également présent chez l'ostéoblaste et impliqué dans le métabolisme osseux.

5.2 Analyses de l'influx calcique induit par la PTH

Après avoir déterminé que les cellules ostéoblastiques MG-63 exprimaient le récepteur PTH2R, nous avons vérifié l'effet de la PTH sur l'influx calcique par des mesures de calcium intracellulaire. Tel qu'observé à la figure 4.2A, l'hormone PTH ne stimule que très faiblement un influx calcique, soit une augmentation relative de la fluorescence d'environ 1.2, et il en est de même pour l'activateur direct de l'adénylate cyclase Forskolin et le PGE₂, qui lui, active cette molécule via le récepteur EP₂ couplé à une protéine G. Le Forskolin est utilisé afin de court-circuiter la signalisation avant l'activation de l'adénylate cyclase afin de s'assurer d'une augmentation significative de l'AMPc intracellulaire. De plus, il est possible d'observer l'absence de mobilisation calcique provenant du RE, ce qui veut dire que ces traitements n'activent pas la voie de signalisation PLC/IP₃. Cette voie augmente le niveau d'IP₃ intracellulaire qui va se fixer à son récepteur sur le RE, ce qui entraîne la sortie de calcium. Ainsi, l'explication possible pour l'absence d'influx est que ce serait plutôt la voie AMPc/PKA qui serait activée, mais le niveau d'activité des enzymes phosphodiésterases chez ces cellules serait importante et procéderait à la dégradation de l'AMPc produite par la stimulation de PTH. Une seconde explication probable serait que le niveau d'expression du PTH2R ne serait pas assez élevé afin de stimuler une production d'AMPc adéquate pour une stimulation d'un influx calcique.

5.3 Effets du dbAMPc et IBMX sur l'influx calcique chez la lignée MG-63

Afin de vérifier l'implication de l'AMPc sur la stimulation de l'influx calcique chez les cellules MG-63, nous avons utilisé des concentrations croissantes de dbAMPc et d'IBMX pour stimuler un influx calcique. Selon la figure 4.3A-B-C, il

est possible de remarquer que les niveaux d'influx calcique augmentent en fonction de la concentration du dbAMPc. Ce résultat appuie le fait que l'augmentation du niveau AMPc intracellulaire stimulerait un influx calcique (de Groot *et al.*, 2009 ; Picotto, Massheimer et Boland, 1997). À la figure 4.3D-E-F, la même stratégie a été utilisée avec des concentrations croissantes d'IBMX, et pareillement qu'avec le dbAMPc, le niveau de l'influx calcique augmente en fonction de la concentration. Ce résultat suggère donc que l'IBMX prévient la dégradation de l'AMPc endogène, menant ainsi à l'augmentation de sa concentration intracellulaire. Ceci favorise donc la stimulation de l'influx calcique par l'AMPc.

5.4 Effet de l'IBMX sur l'influx calcique induit par PTH

Suite aux résultats précédant obtenus avec le traitement de la PTH seul et ceux avec l'IBMX seul, la stimulation par la PTH, le Forskolin et le PGE₂ a été potentialisée par une pré-incubation avec l'IBMX. Il est nécessaire de rappeler qu'avec une concentration de 125 μ M d'IBMX, aucun influx calcique n'est détecté. Ainsi, en prévenant la dégradation de l'AMPc par l'IBMX, la stimulation de l'influx calcique par la PTH serait accentuée. Cela dit, une pré-incubation avec l'IBMX à cette concentration a été réalisée avant d'ajouter les traitements PTH, Forskolin et PGE₂. Selon la figure 4.4, un influx calcique est perceptible suite à ces trois traitements. Ce résultat suggère donc que l'IBMX a la capacité de potentialiser la production d'AMPc par la PTH.

5.5 Production d'AMPc par les cellules ostéoblastiques MG-63 suite à différents traitements.

Afin de compléter les données et la compréhension sur le mécanisme de signalisation engendré par l'AMPc dans le contexte d'une stimulation d'un influx calcique, un dosage de cette molécule a été réalisé suite aux différents traitements. Tout d'abord, selon le tableau 2, la PTH ne semble pas stimuler une production d'AMPc suite à un traitement de 15 minutes. Cela est en accord avec le fait que

l'hormone (non potentialisée par l'IBMX) ne stimule que peu l'influx calcique. Ainsi, les mêmes hypothèses sont avancées afin d'expliquer ce résultat soit par la possible dégradation de l'AMPc par les phosphodiésterases endogènes, soit par le nombre faible de récepteurs de l'hormone localisés à surface de la cellule. Également, une combinaison de ces deux phénomènes serait également probable. D'autre part, les traitements PGE₂ (tableau 2) et Forskolin (tableau 3) stimulent une production d'AMPc de plus de 28 fois celle de la condition contrôle. En réalité, cette stimulation représente la limite supérieure du dosage dans cette expérimentation. Cela dit, ces deux résultats ne vont pas dans la même direction que les résultats présentés à la figure 4.2, qui démontraient une absence d'influx calcique par des traitements seuls de ces deux molécules. Il est donc difficile d'expliquer la raison de ce résultat, mais il est à noter que les expérimentations concernant le dosage de l'AMPc ont été effectuées beaucoup plus tard (concernant les passages cellulaires) que les expériences en microscopie confocale. À ce moment, nous avons pris connaissance d'un article démontrant que la production d'AMPc suite à une stimulation par la PTH augmentait en fonction des passages des cellules ostéoblastiques SaOS-2 (Gao *et al.*, 2002). Toutefois, le mécanisme à l'origine de cette différence de production en AMPc n'a pas été identifié. Cela dit, il aurait été intéressant de réaliser des mesures de calcium intracellulaires simultanément avec les dosages AMPc, et ce, selon les différents passages. Concernant, les résultats avec les traitements IBMX seul (125 µM et 500 µM, tableau 3) il y a une stimulation de la production de l'AMPc, cependant pas au même niveau que le Forskolin et le PGE₂, soit respectivement 1,53 et 2,88 plus que la condition contrôle. Contrairement au Forskolin et au PGE₂, l'IBMX n'est pas un activateur direct de l'adénylate cyclase, mais prévient plutôt la dégradation de l'AMPc par l'inhibition des phosphodiésterases endogènes. Ainsi, l'IBMX ne stimule pas directement la production d'AMPc. C'est donc pour cette raison que la stimulation de l'AMPc par l'IBMX n'est pas au même niveau que le Forskolin et le PGE₂. Par ailleurs, avec une augmentation de la concentration de l'IBMX, une plus grande quantité d'AMPc se retrouve non dégradée dans la cellule, expliquant ainsi le résultat avec la concentration de 500 µM d'IBMX. Finalement, une combinaison de traitements avec

la PTH et l'IBMX (125 μ M) démontre une production d'AMPc supérieure à celle de l'IBMX seul à la même concentration. Ce résultat démontre donc que l'IBMX a la capacité de potentialiser l'effet de la PTH concernant la production d'AMPc.

5.6 Identification des canaux impliqués dans l'influx calcique

L'influx calcique stimulé par la PTH a pu être caractérisé suite à une pré-incubation avec l'IBMX à une concentration assez faible qui ne menait pas à un influx calcique lorsque utilisé seul. Il est maintenant nécessaire d'identifier par quels types de canaux le calcium parvient à entrer suite à cette stimulation avec la PTH. Pour ce faire, des inhibiteurs de différents types de canaux ont été utilisés en pré-incubation avec l'IBMX, soit l'inhibiteur des canaux VDCC (nifédipine), l'inhibiteur des canaux TRPC (gadolinium) et l'inhibiteur des canaux TRPV (rouge de ruthénium). La figure 4.5 montre qu'en présence des inhibiteurs nifédipine et gadolinium, une stimulation d'un influx calcique par la PTH est toujours observée. Ceci exclut donc la possibilité que le calcium extracellulaire soit véhiculé par les canaux VDCC et TRPC. Par contre, il est possible d'observer une différence du taux d'augmentation de la fluorescence entre la nifédipine et le gadolinium. Celle-ci peut être la conséquence d'une différence de confluence cellulaire entre ces conditions. En effet, si la confluence est plus faible, la fluorescence observée peut être diminuée. Également, la qualité du marquage peut engendrer une différence à ce même niveau. En présence du rouge de ruthénium, l'influx calcique est bloqué par l'inhibiteur. Ce résultat détermine donc que l'influx calcique stimulé par l'hormone PTH implique un canal de type TRPV. Cela appuie donc le fait que les canaux TRPV permettent un influx calcique. En effet dans différents types cellulaires comme les cellules rénales, épithéliales et ostéoclastes, les canaux TRPV ont la capacité à véhiculer un influx calcique (de Groot *et al.*, 2009 ; Masuyama *et al.*, 2008 ; Yu *et al.*, 2012).

5.7 Expression des canaux TRPV chez la lignée ostéoblastique MG-63

Après avoir identifié la sous-famille des canaux des TRPV comme étant responsable de l'influx calcique suite à la stimulation par l'hormone PTH, il a fallu

d'abord répertorier tous les TRPV exprimés chez les cellules MG-63. La figure 4.6 montre la présence d'ARNm pour les canaux TRPV2 et TRPV4 dans les cellules MG-63. En effet, une étude réalisée préalablement dans le laboratoire qui visait à répertorier les divers canaux TRP exprimés chez la cellule ostéoblastique, démontre semblablement à la figure 4.6, que ce sont TRPV4 et TRPV2 qui sont exprimés chez les cellules MG-63. De plus, concernant les autres récepteurs TRPV, soit TRPV1, TRPV5 et TRPV6, ils n'ont pas été analysés étant donné qu'une étude antérieure démontre l'absence de ces récepteurs chez l'ostéoblaste (Abed *et al.*, 2009).

5.8 Identification du canal TRPV et de la voie de signalisation responsable de l'influx calcique induit par PTH

Par la suite, nous avons déterminé lequel des canaux TRPV2 ou TRPV4 était responsable de l'influx calcique stimulé par la PTH. Ainsi, des inhibiteurs spécifiques ont été utilisés lors des mesures de calcium intracellulaire, soit le Tranilast pour le TRPV2, et le RN-1734 pour le TRPV4. Ainsi, tel que présenté à la figure 4.7A-B, l'influx calcique induit par la PTH ou le Forskolin n'est pas bloqué par l'inhibiteur Tranilast. Cela exclut donc la possibilité que ce soit le canal TRPV2 qui serait impliqué dans l'influx calcique. Par contre suite à l'utilisation de l'inhibiteur RN-1734, l'influx calcique induit par la PTH ou le Forskolin est complètement bloqué. Ce résultat démontre ainsi que le canal TRPV4 est celui qui permet l'influx calcique suite à la stimulation de l'hormone PTH. Par la suite, nous avons étudié le mécanisme de signalisation par lequel la PTH pouvait stimuler l'influx calcique. Étant donné qu'il est démontré que la PTH active la voie de signalisation AMPc/PKA (Misiorowski, 2011), nous avons utilisé l'inhibiteur de PKA, le H-89 lors de stimulation par la PTH, Forskolin et PGE₂ et dbAMPc. Ainsi, à la figure 4.8, chacune des stimulations amenées par ces molécules a été bloquée par l'inhibiteur H-89. Ce résultat confirme ici que la stimulation de l'hormone PTH active la production d'AMPc, ce qui stimule la PKA qui par la suite active un influx calcique chez les cellules ostéoblastique MG-63. Ce résultat appuie l'étude montrant que la PTH permettait d'activer la protéine kinase A afin d'activer le canal TRPV5 (de Groot *et al.*, 2009). L'explication de cette activation serait par la phosphorylation

d'un résidu thréonine du récepteur TRPV5 (de Groot *et al.*, 2009). Également, il a été démontré que TRPV4 possédait un site de phosphorylation, soit le résidu sérine⁸²⁴, menant à son activation (Fan, Zhang et McNaughton, 2009). Cela dit, il serait nécessaire de procéder à des analyses de phosphorylation du canal TRPV4 chez MG-63 lors d'une stimulation par la PTH afin de valider le mécanisme d'activation par PKA.

5.9 Étude de la migration cellulaire chez les cellules MG-63

Dans les expérimentations précédentes, nous avons rapporté que la stimulation par la PTH lorsque potentialisée par l'IBMX peut stimuler la production d'AMPc menant à un influx calcique par le canal TRPV4. Étant donné qu'il est a été démontré que le calcium était impliqué dans différentes fonctions cellulaires comme la migration, nous avons donc étudié cette fonction par des traitements avec la PTH et différentes molécules comme le Forskolin, les trois inhibiteurs des canaux TRPV (rouge de Ruthénium, RN-1734 et Tranilast), l'inhibiteur PKA et des combinaisons PTH et Forskolin avec ces inhibiteurs (figure 4.10B). L'image supérieure gauche de cette figure démontre une diminution significative de la migration cellulaire avec des traitements en présence de PTH, et davantage avec le Forskolin. À la figure supérieure droite, il est démontré que le rouge de Ruthénium ainsi que le RN-1734 stimulent la migration cellulaire. De plus, ces deux inhibiteurs combinés à la PTH lèvent l'inhibition de la migration induite par la PTH. À la figure inférieure gauche, le même raisonnement s'applique avec l'utilisation du Forskolin. Enfin, à la figure inférieure droite, l'inhibiteur de la PKA H-89 stimule également la migration cellulaire. Également, cet inhibiteur lève l'inhibition engendrée par la PTH et le forskolin. À propos des effets de la voie de signalisation AMPc/PKA sur la fonction de migration cellulaire, il y a une dichotomie. Certaines études démontrent des effets inhibiteurs sur la migration suite à l'activation de PKA menant à des changements dans l'architecture cellulaire (Howe, 2004). Cette étude est en accord avec nos résultats qui montrent que la PTH et le Forskolin inhibent la migration des cellules MG-63. Étant un activateur direct de l'adénylate cyclase, l'effet du Forskolin serait

ainsi beaucoup plus fort comparativement à la PTH. Par contre, la littérature présente également des effets contradictoires pour la PTH. Une étude démontre une stimulation de la migration des cellules MG-63 par des traitements intermittents à la PTH durant les six premières heures d'une période de 24 heures, et cela à deux reprises (Berdiaki *et al.*, 2010). Ainsi, il aurait été intéressant de reproduire cette expérimentation afin de comparer le traitement continu, que nous avons réalisé, et ce traitement intermittent. Ce peptide est incapable d'activer l'adénylate cyclase, car elle active plutôt la sous-unité $G_{q/11}$ responsable de l'activité de la phospholipase C (Sneddon *et al.*, 2004). Ainsi, la PKA ne pouvant pas être activée, n'empêche donc pas la migration. Les études explorant le lien entre les canaux cationiques TRPV et la migration sont très peu nombreuses et contradictoires, mais une stipule que l'activation du canal TRPV4 réduit la migration cellulaire chez les cellules neuroendocrines immortalisées en rétractant les structures filopodes, qui sont des projections d'actine du cytosquelette impliquées dans la zone mobile de la cellule (Zaninetti *et al.*, 2011). Ainsi, le rouge de Ruthénium et le RN-1734 stimulent la migration en bloquant l'ouverture occasionnelle des canaux TRPV4 en condition basale. Jusqu'à maintenant aucune littérature ne mentionne une stimulation de la migration par le rouge de Ruthénium ou le RN-1734. Ainsi, des analyses concernant le canal TRPV4, comme un silence génique seraient intéressantes afin de décrire l'implication de ce canal dans la migration cellulaire. Concernant l'action du H-89, cela démontre que l'inhibition de la voie AMPc/PKA stimule la migration ce qui appuie davantage l'hypothèse que cette voie pouvait inhiber cette fonction cellulaire. Enfin, selon différentes études l'ampleur, l'espace, le temps de l'activité de la voie AMPc/PKA ou ces trois paramètres simultanément seraient cruciaux sur la migration cellulaire (Howe, 2004).

5.10 Analyses morphologiques des cellules MG-63

Nos résultats indiquent une stimulation de la migration par des traitements avec les inhibiteurs rouge de Ruthénium, RN-1734, H-89, et que ceux-ci renversent l'inhibition engendrée par la PTH et le Forskolin. Alors, nous avons réalisé des

analyses de la morphologie cellulaire chez ces mêmes cellules afin d'observer des modifications du cytosquelette suite à ces traitements. Suite aux mêmes traitements réalisés à l'expérimentation précédente, des structures cellulaires comparables à des filopodes semblent se développer à la suite des traitements qui stimulent la migration cellulaire (figure 4.9). Ces résultats démontrent que ces projections cytoplasmiques seraient développées et impliquées dans la migration cellulaire suite à la stimulation de ces traitements. Ces structures composées de filaments d'actine seraient impliquées dans la locomotion cellulaire en formant des points d'adhésion focaux avec le substrat. Ainsi, il aurait été intéressant de compléter cette étude de la migration et de la morphologie cellulaire par une analyse de formation de points focaux suite à ces traitements, par exemple, par l'analyse de l'expression de la protéine cytoplasmique FAK («Focal Adhesion Kinase») qui est liée aux intégrines responsables de l'adhésion (Xue, Janzen et Knecht, 2010). Concernant la PTH et le Forskolin, ces projections cytoplasmiques en filopodes sont moins visibles et cela serait en accord avec l'hypothèse que la stimulation de la voie AMPc/PKA inhiberait la mobilité cellulaire et la modification architecturale des filaments d'actine (Howe, 2004). Enfin, il est décrit dans la littérature que l'influx de calcium agirait comme signal de rétro-inhibition lors de la déformation cellulaire. Ainsi, il serait intéressant de pousser les analyses de migration cellulaire et de morphologie en comparant avec un activateur du canal TRPV4.

Conclusion

L'hormone PTH est utilisée comme traitement de l'ostéoporose depuis environ 10 ans. Par contre, son effet sur les fonctions ostéoblastiques impliquant le calcium nécessite une meilleure compréhension. Ce projet a donc pu déterminer chez les cellules ostéoblastiques humaines MG-63 que le récepteur PTH2R était exprimé chez ces cellules. Selon nos résultats, le récepteur PTH1R ne serait pas exprimé, mais on ne peut officiellement l'affirmer. Ensuite, il a été démontré qu'une stimulation de l'hormone PTH provoque un influx calcique, lorsque potentialisé avec l'IBMX. La raison de cette potentialisation réside dans la production d'un niveau adéquat d'AMPc intracellulaire lors d'un prétraitement avec l'IBMX. De plus, après avoir déterminé que les canaux TRPV2 et TRPV4 étaient exprimés chez la lignée MG-63, cet influx calcique serait véhiculé plus précisément par le canal TRPV4 et le mécanisme cellulaire impliquerait la voie de signalisation via AMPc/PKA. Concernant les effets sur la fonction de migration cellulaire, l'hormone a un effet d'inhibition et qui serait induit par l'activité de PKA, ce qui se reflète par l'absence de formation de projections cytoplasmique filopodes lors d'analyses de la morphologie cellulaire (figure 6.1)

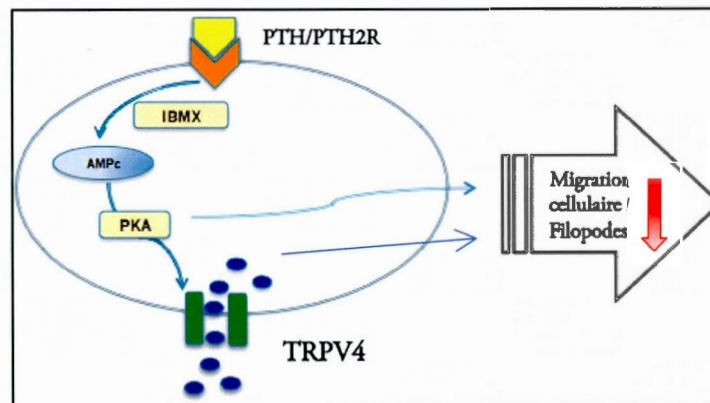


Figure 6.1 : Schéma récapitulatif résumant les principaux résultats et perspectives. Chez l'ostéoblaste, l'hormone PTH se lierait au récepteur PTH2R et induirait une production d'AMPc lorsque potentialisée par l'IBMX, ce qui activerait la PKA. Cette protéine serait responsable d'activer TRPV4 et ainsi permettre un influx calcique et serait responsable de l'inhibition de la migration cellulaire.

Cela dit, il serait nécessaire de reproduire et comparer ces analyses avec un modèle cellulaire ostéoblastique reconnu pour exprimer le récepteur PTH1R. De plus, concernant les analyses de migration et morphologie cellulaire, il serait intéressant de réaliser des traitements intermittents avec l'hormone pour comparer avec un traitement continu. Toujours pour ces mêmes analyses, un activateur du canal TRPV4 permettrait de comparer les effets avec l'inhibiteur RN-1734. En somme, ces données divulguent de nouvelles connaissances concernant une stimulation avec l'hormone PTH sur les ostéoblastes impliquant les canaux TRPV et permettent de comprendre davantage l'implication du calcium et ses canaux concernant les fonctions ostéoblastiques, et ce, dans l'optique du traitement de l'ostéoporose par la PTH.

Bibliographie

- Abed, E., D. Labelle, C. Martineau, A. Loghin et R. Moreau. 2009. «Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells». *Mol Membr Biol*, vol. 26, no 3, p. 146-158.
- Baird, K., S. Davis, C. R. Antonescu, U. L. Harper, R. L. Walker, Y. Chen, A. A. Glatfelter, P. H. Duray et P. S. Meltzer. 2005. «Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology». *Cancer Res*, vol. 65, no 20, p. 9226-9235.
- Berdiaki, A., G. A. Datsis, D. Nikitovic, A. Tsatsakis, P. Katonis, N. K. Karamanos et G. N. Tzanakakis. 2010. «Parathyroid hormone (PTH) peptides through the regulation of hyaluronan metabolism affect osteosarcoma cell migration». *IUBMB Life*, vol. 62, no 5, p. 377-386.
- Brewer, H. B., Jr., T. Fairwell, R. Ronan, G. W. Sizemore et C. D. Arnaud. 1972. «Human parathyroid hormone: amino-acid sequence of the amino-terminal residues 1-34». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 69, no 12, p. 3585-3588.
- Chakravarti, B., N. Chattopadhyay et E. M. Brown. 2012. «Signaling through the extracellular calcium-sensing receptor (CaSR)». *Adv Exp Med Biol*, vol. 740, p. 103-142.
- Clapham, D. E., L. W. Runnels et C. Strubing. 2001. «The TRP ion channel family». *Nat Rev Neurosci*, vol. 2, no 6, p. 387-396.
- Cranney, A., A. Papaioannou, N. Zytaruk, D. Hanley, J. Adachi, D. Goltzman, T. Murray et A. Hodsman. 2006. «Parathyroid hormone for the treatment of osteoporosis: a systematic review». *CMAJ*, vol. 175, no 1, p. 52-59.
- Czekanska, E. M., M. J. Stoddart, R. G. Richards et J. S. Hayes. 2012. «In search of an osteoblast cell model for in vitro research». *Eur Cell Mater*, vol. 24, p. 1-17.
- Datta, N. S., T. A. Samra, C. D. Mahalingam, T. Datta et A. B. Abou-Samra. 2010. «Role of PTH1R internalization in osteoblasts and bone mass using a phosphorylation-deficient knock-in mouse model». *J Endocrinol*, vol. 207, no 3, p. 355-365.
- de Groot, T., K. Lee, M. Langeslag, Q. Xi, K. Jalink, R. J. Bindels et J. G. Hoenderop. 2009. «Parathyroid hormone activates TRPV5 via PKA-dependent phosphorylation». *J Am Soc Nephrol*, vol. 20, no 8, p. 1693-1704.
- Dimitrova, P., A. Toncheva, V. Gyurkovska et N. Ivanovska. 2011. «Involvement of soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (sRANKL) in collagenase-induced murine osteoarthritis and human osteoarthritis». *Rheumatol Int*.

Fan, H. C., X. Zhang et P. A. McNaughton. 2009. «Activation of the TRPV4 ion channel is enhanced by phosphorylation». *J Biol Chem*, vol. 284, no 41, p. 27884-27891.

Fazzalari, N. L. 2008. «Bone remodeling: A review of the bone microenvironment perspective for fragility fracture (osteoporosis) of the hip». *Semin Cell Dev Biol*, vol. 19, no 5, p. 467-472.

Fernandes, E. S., L. Liang, S. J. Smillie, F. Kaiser, R. Purcell, D. W. Rivett, S. Alam, S. Howat, H. Collins, S. J. Thompson, J. E. Keeble, Y. Riffo-Vasquez, K. D. Bruce et S. D. Brain. 2012. «TRPV1 deletion enhances local inflammation and accelerates the onset of systemic inflammatory response syndrome». *J Immunol*, vol. 188, no 11, p. 5741-5751.

Gao, H., P. V. Bodine, R. Murrills, F. J. Bex, J. P. Bilezikian et S. A. Morris. 2002. «PTH-dependent adenylyl cyclase activation in SaOS-2 cells: passage dependent effects on G protein interactions». *J Cell Physiol*, vol. 193, no 1, p. 10-18.

Gothlin, G., et J. L. Ericsson. 1976. «The osteoclast: review of ultrastructure, origin, and structure-function relationship». *Clin Orthop Relat Res*, no 120, p. 201-231.

Hartmann, B., R. Riedel, K. Jorss, C. Loddenkemper, A. Steinmeyer, U. Zugel, M. Babina, A. Radbruch et M. Worm. 2012. «Vitamin D receptor activation improves allergen-triggered eczema in mice». *J Invest Dermatol*, vol. 132, no 2, p. 330-336.

Hock, J. M. 2001. «Anabolic actions of PTH in the skeletons of animals». *J Musculoskelet Neuronal Interact*, vol. 2, no 1, p. 33-47.

Hodsman, A. B., D. C. Bauer, D. W. Dempster, L. Dian, D. A. Hanley, S. T. Harris, D. L. Kendler, M. R. McClung, P. D. Miller, W. P. Olszynski, E. Orwoll et C. K. Yuen. 2005. «Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use». *Endocr Rev*, vol. 26, no 5, p. 688-703.

Hofmann, F., L. Lacinova et N. Klugbauer. 1999. «Voltage-dependent calcium channels: from structure to function». *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, vol. 139, p. 33-87.

Howe, A. K. 2004. «Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1692, no 2-3, p. 159-174.

Huang, J. C., T. Sakata, L. L. Pflieger, M. Bencsik, B. P. Halloran, D. D. Bikle et R. A. Nissenson. 2004. «PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG». *J Bone Miner Res*, vol. 19, no 2, p. 235-244.

- Kano, J., T. Sugimoto, M. Fukase et K. Chihara. 1994. «Direct involvement of cAMP-dependent protein kinase in the regulation of alkaline phosphatase activity by parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide in osteoblastic UMR-106 cells». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 199, no 1, p. 271-276.
- Krishnan, V., T. L. Moore, Y. L. Ma, L. M. Helvering, C. A. Frolik, K. M. Valasek, P. Ducy et A. G. Geiser. 2003. «Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling». *Mol Endocrinol*, vol. 17, no 3, p. 423-435.
- LeMessurier, J., S. O'Donnell, P. Walsh, L. McRae et C. Bancej. 2012. «The development of national indicators for the surveillance of osteoporosis in Canada». *Chronic Dis Inj Can*, vol. 32, no 2, p. 101-107.
- Czekanska, E. M., M. J. Stoddart, R. G. Richards et J. S. Hayes. 2012. «In search of an osteoblast cell model for in vitro research». *Eur Cell Mater*, vol. 24, p. 1-17. NLM.
- Li, M., D. D. Thompson et V. M. Paralkar. 2007. «Prostaglandin E(2) receptors in bone formation». *Int Orthop*, vol. 31, no 6, p. 767-772. NLM.
- Macrez, N., et J. Mironneau. 2004. «Local Ca²⁺ signals in cellular signalling». *Curr Mol Med*, vol. 4, no 3, p. 263-275.
- Mannstadt, M., H. Juppner et T. J. Gardella. 1999. «Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties». *Am J Physiol*, vol. 277, no 5 Pt 2, p. F665-675.
- Masuyama, R., J. Vriens, T. Voets, Y. Karashima, G. Owsianik, R. Vennekens, L. Lieben, S. Torrekens, K. Moermans, A. Vanden Bosch, R. Bouillon, B. Nilius et G. Carmeliet. 2008. «TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts». *Cell Metab*, vol. 8, no 3, p. 257-265.
- Mellor, H., et P. J. Parker. 1998. «The extended protein kinase C superfamily». *Biochem J*, vol. 332 (Pt 2), p. 281-292.
- Misiorowski, W. 2011. «Parathyroid hormone and its analogues--molecular mechanisms of action and efficacy in osteoporosis therapy». *Endokrynol Pol*, vol. 62, no 1, p. 73-78.
- Montell, C. 2005. «TRP channels in Drosophila photoreceptor cells». *J Physiol*, vol. 567, no Pt 1, p. 45-51.
- Mutgi, K., et J. Koo. 2012. «Update on the Role of Systemic Vitamin D in Atopic Dermatitis». *Pediatr Dermatol*.

- Ohta, Y., K. Nakagawa, Y. Imai, T. Katagiri, T. Koike et K. Takaoka. 2008. «Cyclic AMP enhances Smad-mediated BMP signaling through PKA-CREB pathway». *J Bone Miner Metab*, vol. 26, no 5, p. 478-484.
- Owen, M. 1978. «Histogenesis of bone cells». *Calcif Tissue Res*, vol. 25, no 3, p. 205-207.
- Pedersen, S. F., G. Owsianik et B. Nilius. 2005. «TRP channels: an overview». *Cell Calcium*, vol. 38, no 3-4, p. 233-252.
- Picotto, G., V. Massheimer et R. Boland. 1997. «Parathyroid hormone stimulates calcium influx and the cAMP messenger system in rat enterocytes». *Am J Physiol*, vol. 273, no 4 Pt 1, p. C1349-1353.
- Pollard, T. D., et G. G. Borisy. 2003. «Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments». *Cell*, vol. 112, no 4, p. 453-465.
- Poole, K. E., et J. Reeve. 2005. «Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent». *Curr Opin Pharmacol*, vol. 5, no 6, p. 612-617.
- Putney, J. W., Jr., et R. R. McKay. 1999. «Capacitative calcium entry channels». *Bioessays*, vol. 21, no 1, p. 38-46.
- Raisz, L. G. 1999. «Physiology and pathophysiology of bone remodeling». *Clin Chem*, vol. 45, no 8 Pt 2, p. 1353-1358.
- Rey, A., D. Manen, R. Rizzoli, J. Caverzasio et S. L. Ferrari. 2006. «Proline-rich motifs in the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptor C terminus mediate scaffolding of c-Src with beta-arrestin2 for ERK1/2 activation». *J Biol Chem*, vol. 281, no 50, p. 38181-38188.
- Ryan, G. L., N. Watanabe et D. Vavylonis. 2012. «A review of models of fluctuating protrusion and retraction patterns at the leading edge of motile cells». *Cytoskeleton (Hoboken)*, vol. 69, no 4, p. 195-206.
- Schluter, K. D. 1999. «PTH and PTHrP: Similar Structures but Different Functions». *News Physiol Sci*, vol. 14, p. 243-249.
- Schnoke, M., S. B. Midura et R. J. Midura. 2009. «Parathyroid hormone suppresses osteoblast apoptosis by augmenting DNA repair». *Bone*, vol. 45, no 3, p. 590-602.
- Sneddon, W. B., C. E. Magyar, G. E. Willick, C. A. Syme, F. Galbiati, A. Bisello et P. A. Friedman. 2004. «Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone (PTH) receptor: conditional efficacy of PTH peptide fragments». *Endocrinology*, vol. 145, no 6, p. 2815-2823.

Straus, S. E. 2001. «Geriatric medicine». *BMJ*, vol. 322, no 7278, p. 86-89.

Suda, N., M. T. Gillespie, K. Traianedes, H. Zhou, P. W. Ho, D. K. Hards, E. H. Allan, T. J. Martin et J. M. Moseley. 1996. «Expression of parathyroid hormone-related protein in cells of osteoblast lineage». *J Cell Physiol*, vol. 166, no 1, p. 94-104.

Trouvin, A. P., et V. Goeb. 2010. «Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss». *Clin Interv Aging*, vol. 5, p. 345-354.

Tyson, D. R., J. T. Swarthout et N. C. Partridge. 1999. «Increased osteoblastic c-fos expression by parathyroid hormone requires protein kinase A phosphorylation of the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein at serine 133». *Endocrinology*, vol. 140, no 3, p. 1255-1261.

Usdin, T. B., C. Grüber et T. I. Bonner. 1995. «Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor». *J Biol Chem*, vol. 270, no 26, p. 15455-15458.

Ward, B. K., A. L. Magno, J. P. Walsh et T. Ratajczak. 2012. «The role of the calcium-sensing receptor in human disease». *Clin Biochem*, vol. 45, no 12, p. 943-953.

Xue, F., D. M. Janzen et D. A. Knecht. 2010. «Contribution of Filopodia to Cell Migration: A Mechanical Link between Protrusion and Contraction». *Int J Cell Biol*, vol. 2010, p. 507821.

Yamaguchi, A., T. Komori et T. Suda. 2000. «Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1». *Endocr Rev*, vol. 21, no 4, p. 393-411.

Yamakage, M., et A. Namiki. 2002. «Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review». *Can J Anaesth*, vol. 49, no 2, p. 151-164.

Yu, H., Q. Li, X. Zhou, V. P. Kolosov et J. M. Perelman. 2012. «Transient receptor potential vanilloid 1 receptors mediate acid-induced mucin secretion via Ca²⁺ influx in human airway epithelial cells». *J Biochem Mol Toxicol*, vol. 26, no 5, p. 179-186.

Zaninetti, R., A. Fornarelli, M. Ciarletta, D. Lim, A. Caldarelli, T. Pirali, A. Cariboni, G. Owsianik, B. Nilius, P. L. Canonico, C. Distasi et A. A. Genazzani. 2011. «Activation of TRPV4 channels reduces migration of immortalized neuroendocrine cells». *J Neurochem*, vol. 116, no 4, p. 606-615.